

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'AGENT ANTICONVULSANT VALPROATE INDUIT
L'EXPRESSION DE LA PIMT VIA LA VOIE DE SIGNALISATION
PI3K/AKT/GSK-3

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
SLAVISA CORLUKA

AOÛT 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner ma gratitude au Dr. Richard Desrosiers, mon directeur de recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ma recherche, mais aussi pour ses innombrables conseils et les nombreuses heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. De plus, son dévouement pour la science, la discipline ainsi que la rigueur scientifique seront pour moi des exemples à suivre.

De plus, j'aimerais remercier mes collègues de laboratoire Irvens Fanalus et Dahman Ouazia pour leurs conseils techniques, mais aussi pour leur pleine collaboration tout au long de ma maîtrise.

Finalement, je voudrais remercier Philippe Cournoyer, mon mentor au tout début de ma maîtrise en chimie, pour ses nombreux conseils et pour la démonstration de plusieurs techniques de laboratoire.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ.....	viii

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1.1 Les méthyltransférases	1
1.2 La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase.....	2
1.2.1 Historique	2
1.2.2 Caractéristiques	3
1.2.3 Formation des résidus aspartates isomérisés.....	5
1.2.4 Réparation des résidus aspartates anormaux par la PIMT	7
1.2.5 Rôles et implications biologiques de la PIMT	9
1.3 Acide valproïque	11
1.3.1 Historique et propriétés	11
1.3.2 Mécanismes d'induction de la PIMT par l'acide valproïque.....	13
1.4 Objectif de la recherche	17

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES	19
2.1 Matériels	19
2.2 Méthodes	20
2.2.1 Culture cellulaire	20
2.2.2 Traitement des cellules avec les inhibiteurs pharmacologiques.....	20

2.2.3 Transfection des cellules avec un siRNA contre Akt1	20
2.2.4 Lyse cellulaire	21
2.2.5 Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type western.....	21
2.2.6 Immunodétection	22
2.2.7 Activité méthyltransférase	22
2.2.8 Analyses statistiques	23

CHAPITRE III

RÉSULTATS	24
3.1 Stimulation de l'expression de la PIMT en présence du VPA.....	24
3.2 Le VPA augmente l'activité méthyltransférase de la PIMT dans les cellules SH-SY5Y.....	25
3.3 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA est dépendante de la voie PI3K	25
3.4 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA est dépendante de la kinase Akt	26
3.5 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA est dépendante de la kinase GSK-3	27
3.6 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA ne dépend pas du facteur de transcription CREB	28

CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	37
CONCLUSION.....	41
BIBLIOGRAPHIE	42

Figure	Page
1.1 Structure cristalline de la PIMT humaine	4
1.2 Mécanismes de formation des résidus isoaspartates	6
1.3 Mécanismes de réparation des résidus aspartates isomérisés par la PIMT	8
1.4 Structure chimique de l'acide valproïque	12
1.5 Représentation schématique des voies de signalisation responsables de l'induction de la PIMT par l'acide valproïque	14
1.6 Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/Akt.....	15
1.7 L'inhibition de GSK-3 permet l'activation du facteur de transcription CREB.....	17
3.1 Cinétique de l'expression de la PIMT en présence de l'acide valproïque	29
3.2 L'acide valproïque augmente l'activité méthyltransférase de la PIMT dans les cellules SH-SY5Y	30
3.3 L'induction de l'expression de la PIMT par VPA est dépendante de la voie PI3K/Akt.....	31
3.4 L'induction de l'expression de la PIMT par VPA est dépendante de la kinase Akt	33
3.5 L'induction de l'expression de la PIMT par VPA est dépendante de la kinase GSK-3.....	35
3.6 L'induction de l'expression de la PIMT par VPA ne dépend pas du facteur de transcription CREB	36

LISTE DES ABRÉVIATIONS

vi

AdoHcy	S-adénosyle-L-homocystéine
AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt/PKB	Akt/Protéine-kinase B
ANOVA	One-way analysis of variance
APP	Amyloid precursor protein
APS	Persulfate d'ammonium
ARE	<i>Antioxydant response element</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CRE	<i>Cyclic AMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
DSIP-iaoD	Delta-Sleep-Inducing peptide isomérisé
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
ECL	Enhanced chemiluminescence
ERE	Estrogen response element
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Sérum bovin du fœtus
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PBS	Solution saline phosphate tamponnée
PKC	Protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase

PIMT	Protéine-L-isoaspartate (D-aspartate)-méthyltransférase	
PNF	Plaques neurofibrillaires	
PP2A	Protéine phosphatase 2A	vii
PVDF	Fluorure de polyvinylidène	
SDS	Sodium dodécyl sulfate	
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis	
siRNA	Small interfering ribonucleic acid	
TBS	Tampon Tris salin	
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine	
VPA	Acide valproïque	
XRE	Xenobiotic response element	

RÉSUMÉ

Les protéines subissent des modifications post-traductionnelles tout au long de leur vieillissement mais aussi dans certains états pathologiques. Parmi ces modifications progressives des protéines, on retrouve notamment la formation des résidus aspartates isomérisés. La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT) reconnaît et répare des résidus L-isoaspartates anormaux retrouvés dans des protéines. Il a été démontré que la PIMT joue un rôle crucial dans la formation et le maintien du système nerveux central. Ainsi, son fonctionnement s'est avéré important dans le désordre neurologique qu'est l'épilepsie, mais aussi potentiellement dans certaines maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer. Notre laboratoire a déjà démontré que l'acide valproïque (VPA), un médicament anticonvulsant, induit l'expression de la PIMT via la voie de signalisation de ERK et également la voie de signalisation glycogène-synthase-kinase-3 (GSK-3)/ β -caténine. Le but de notre recherche a été d'identifier des nouvelles voies de signalisation qui contrôlent l'expression de la PIMT lorsque celle-ci est stimulée par le VPA. Comme modèle cellulaire nous avons utilisé des neuroblastomes SH-SY5Y qui ont été traités avec le VPA pour étudier l'implication de la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt dans l'induction de la PIMT. Nos résultats montrent que lors de l'induction de la PIMT par VPA, la protéine Akt est phosphorylée (Thr 308). De plus, lorsque la protéine PI3K est inhibée par des inhibiteurs pharmacologiques, wortmannin et le LY294002, la phosphorylation de Akt est bloquée et l'induction de la PIMT par VPA est arrêtée. L'inhibition de Akt par un siRNA spécifique produit le même effet. Également, lorsque la voie de signalisation PI3K/Akt est stimulée par le VPA on observe une phosphorylation de la protéine GSK-3 (Ser 21) qui est également observable lorsque les cellules sont traitées avec le lithium, un inhibiteur directe de GSK-3. Finalement, l'inhibition du facteur de transcription CREB avec un siRNA spécifique n'a pas affecté l'induction de la PIMT par VPA. En conclusion, notre étude a démontrée que l'induction de la PIMT par VPA est dépendante de la voie de signalisation PI3K/Akt. L'activation de cette voie de signalisation permet la phosphorylation et donc l'inhibition de la kinase GSK-3, mais l'induction de la PIMT par VPA est indépendante de facteur de transcription CREB. Ces résultats suggèrent plutôt que VPA en inhibant la kinase GSK-3 stabilise la β -caténine permettant ainsi l'expression de la PIMT.

Mots-Clés : PIMT, épilepsie, VPA, PI3K/Akt

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les méthyltransférases

La méthylation est une modification post-traductionnelle très importante autant chez les procaryotes que les eucaryotes. La méthylation est catalysée grâce à des protéines qu'on appelle des méthyltransférases. Les substrats des méthyltransférases peuvent être l'ADN, l'ARN et les protéines. Ce processus est dépendant du transfert d'un groupement méthyle à partir de la S-adenosyl L-méthionine (AdoMet), un donneur de groupements méthyles présent dans les cellules. La méthylation des protéines est un élément important dans leur maturation et il existe deux types de méthyltransférases qui modifient les protéines, soit les protéines N-méthyltransférases et les protéines carboxyle méthyltransférases.

Les protéines N-méthyltransférases méthylent certaines protéines sur le groupement amine des acides aminés dont les arginines, les lysines et les histidines (Aletta et al., 1998). Elles participent ainsi à la transduction des signaux (Stock et al., 1990), régulation de la transcription génétique (Chen et al., 1999), exportation des ribonucleoprotéines (Shen et al., 1998) et possiblement l'épissage des ARNm (Friesen et al., 2001).

Les protéines carboxyle-méthyltransférases catalysent la méthylation des acides aminés sur le groupement carboxyle libre. Il existe quatre catégories de protéines carboxyle méthyltransférases qui se distinguent selon le type de résidus qu'elles modifient. La première catégorie est la protéine leucine-méthyltransférase. Comme son nom le dit, elle méthyle les résidus leucines sur un groupement carboxyle libre. Elle est notamment reconnue pour méthyle la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Lee et Stock., 1993). PP2A est une protéine impliquée dans le métabolisme des hydrates de carbone, acides aminés et lipides. De plus, PP2A est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Pour cette raison, on suggère que la protéine leucine méthyltransférase pourrait participer au contrôle du cycle cellulaire (Xie et Clarke., 1994). La deuxième catégorie des protéines carboxyle méthyltransférases est l'isoprényl L-cystéine méthyltransférases. Ces protéines méthylent les

résidus cystéines isoprénylés et elles sont retrouvées uniquement dans les membranes (Dai et al., 1998). Parmi les cibles des protéines isoprényl L-cystéine méthyltransférases, on retrouve la GMPC phosphodiesterase et des protéines G impliquées dans la signalisation cellulaire comme les protéines Ras et Rho (Bergo et al., 2004). La troisième catégorie des protéines carboxyl méthyltransférases est les L-glutamylméthyltransférases. Elles méthylent les résidus glutamates sur un groupement carboxyle libre. Ce type de méthyltransférases est uniquement retrouvé chez les bactéries et elles sont impliquées dans la méthylation des protéines chimioréceptrices (Stock, 1990). Finalement la dernière catégorie des protéines carboxyl méthyltransférases est la protéine L-isoaspartyl méthyltransférase. Elle méthyle des résidus aspartyles isomérisés anormaux (Galletti et al., 1995).

1.2 La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase

1.2.1 Historique

La protéine L-isoaspartyl méthyltransférase (PIMT) fut premièrement identifiée, à partir d'un extrait hypophysaire, par Axelrod et Daley en 1965 et on la nomma alors « enzyme produisant le méthanol ». En effet, dans cette étude de l'AdoMet marqué avec $[H^3]$ radioactif a été ajouté à l'extrait hypophysaire et on a pu observer la formation du méthanol radioactif. Dans les années suivant la découverte de la PIMT, deux autres études ont démontrées que la méthylation par l'enzyme s'effectue sur un groupement carboxyle (Liss et al., 1969. Kim et Paik 1970). À ce moment on suggéra que ce sont les résidus Asp et/ou Glu qui étaient modulées par la PIMT. Kim et Paik en 1970 ont été également les premiers à purifier l'enzyme à partir du thymus de rat et ils la nommèrent protéine méthylase-II. En 1973, on est arrivé à un consensus que l'enzyme étudiée par Kim, Paik et Liss était la même que Axelrod et Daley ont identifiée en 1965.

Entre 1975 et 1984, un grand nombre de publications tentent de lier la PIMT à plusieurs fonctions cellulaires. En 1975, Kort et al. ont démontré que la carboxyle méthylation des protéines membranaires des bactéries pourrait jouer un rôle dans la régulation de la réponse chimiotactique. Chez les eucaryotes, des études suggèrent que la PIMT pourrait jouer un rôle dans la stimulation de la sécrétion au niveau des cellules neuroendocrines. De plus, des études de Clarke, (1985) et Barten et Q'Dea, (1990) ont suggéré que la PIMT pourrait jouer

un rôle dans le relargage des vésicules, l'entreposage des hormones et la régulation de l'activité de la calmoduline. Cependant, une mauvaise connaissance des substrats de la PIMT limite l'identification des rôles de cette protéine. En 1984, deux études confirment que le groupement α -carboxyle du résidu isoaspartyl issu d'une désamidation dans la protéine adrénocorticotropine était un site idéal pour la méthylation par la protéine carboxyle méthyltransférase (Aswad D.W 1984 ; Murray et Clark 1984). Également, dans l'étude de Murray et Clark on a pris en compte deux conformations optiques (L et D) du résidu isoaspartate et on a démontré clairement que l'enzyme méthyltransférase avait une préférence pour le résidu L-isoaspartate. À partir de ce moment on appela cette enzyme la PIMT (protéine L-isoaspartate méthyletransférase). La découverte du site de méthylation des substrats de la PIMT a permis d'expliquer l'instabilité et la faible stoechiométrie de la réaction de méthylation de la PIMT observée dans les études antérieures. En effet, le groupement méthyl ester formé sur un résidu L-isoaspartate est fortement susceptible à la cyclisation et à l'hydrolyse. Cette capacité de la PIMT à méthyler les résidus isoaspartates amène la possibilité que la PIMT pourrait participer à la réparation des résidus aspartates endommagés. Des études ultérieures sur la PIMT se concentreront sur les capacités réparatrices de la PIMT au niveau des protéines endommagées mais aussi sur les fonctions biologiques, surtout au niveau du cerveau, de cette enzyme.

1.2.2 Caractéristiques

La PIMT est une enzyme hautement conservée et elle est retrouvée chez les procaryotes, eucaryotes et les mycètes (Barten et O'Dea, 1990). C'est une protéine d'environ 24 500 daltons dont on a identifié deux isoformes (Aswad et Deight, 1983). Chez les humains, l'isoforme I contient 226 acides aminés et l'isoforme II en contient 227 (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992). L'extrémité c-terminale de l'isoforme I se termine par la séquence -RWK (arginine-tryptophane-lysine) et pour l'isoforme II par la séquence -RDEL (arginine-aspartate-glutamate-leucine). En raison de cette différence, les deux isoformes ont un point isoélectrique différent, 6,6 pour l'isoforme I et 5,5 pour l'isoforme II (Ota, Gilbert et Clarke, 1988).

La formation des deux isoformes est le résultat d'un épissage alternatif d'un seul gène situé dans le chromosome 6 (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992). Chez les humains, le gène de la PIMT a une taille d'environ 60 kb et est constitué de 8 exons et 7 introns. Dans la région du promoteur on retrouve plusieurs séquences consensus correspondant à certains éléments de réponse. On y retrouve notamment, les motifs ARE (*antioxydant response element*), XRE (*xenobiotic response element*), CRE (*cyclic AMP response element*) et ERE (*estrogen response element*) (DeVry, Tsai et Clarke, 1996). De plus, on a identifié des sites polymorphiques au sein du gène de la PIMT ce qui peut avoir une incidence sur la spécificité de l'enzyme envers ses substrats (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992 ; Tsai et Clarke, 1994). En effet, le polymorphisme se retrouve sur l'acide aminé à la position 119 (Clarke, 2003). La substitution du troisième nucléotide de ce codon peut donner une isoleucine (Ile) ou une valine (Val). Des études ont montré que la forme Ile-119 possède une activité spécifique plus élevée et une meilleure thermostabilité et que la forme Val-119 possède une meilleure affinité pour les protéines endommagées (David et al., 1997; DeVry et Clarke, 1999).

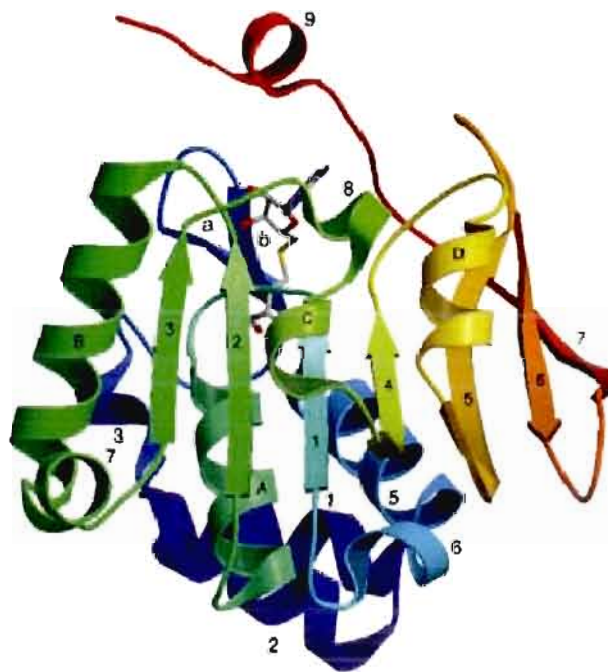


Figure 1.1 : Structure cristalline de la PIMT humaine (Tiré de Ryttersgaard et al., 2002)

La structure cristalline de la PIMT (figure 1.1) (Ryttersgaard et al., 2002) a permis de mieux comprendre le mécanisme catalytique de la PIMT. Ainsi, on constate que le site catalytique de la PIMT est situé au centre de la protéine. Ce site catalytique lie l'AdoMet et permet le relâchement du S-adénosyle-L-homocysteine (AdoHcy). Dû au fait que le site catalytique est profondément enfui au sein de la protéine, cela suggère que l'AdoMet devient un facteur limitant de la réaction. De plus, la structure cristalline a démontré que le site catalytique de la PIMT contient deux acides aminés chargés négativement. Il s'agit de Asp-83 et Asp-109 et il a été démontré qu'ils sont essentiels à la liaison d'AdoMet. Également, ces deux résidus sont fortement conservés chez les différentes espèces ce qui montre leur importance.

1.2.3 Formation des résidus aspartates isomérisés

Tout au long de leur vieillissement, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles spontanées altérant ainsi leur forme et par conséquent leur fonction. Parmi des dommages spontanés que peut subir une protéine, on retrouve la désamination des asparagines et l'isomérisation des acides aspartiques (Johnson B. A et Aswad D. W., 1995). Ces modifications post-traductionnelles engendrent une perte de fonction et souvent une accumulation des protéines endommagées.

La possibilité que certains peptides peuvent contenir des résidus isomérisés était connue bien avant qu'on réalise que ceux-ci peuvent avoir une importance biologique et être un substrat pour des méthyltransférases. En 1960, les peptides contenant des isoAsp ont permis le séquençage par la dégradation d'Edman (Smyth et al., 1963). De plus, on mentionne que des peptides contenant des résidus Asp-Gly sont particulièrement difficiles à synthétiser car ils sont souvent sujets à l'isomérisation et désamination (Ondetti et al., 1968). Les travaux initiaux sur des résidus isomérisés ont permis d'éventuellement démontrer leur importance biologique.

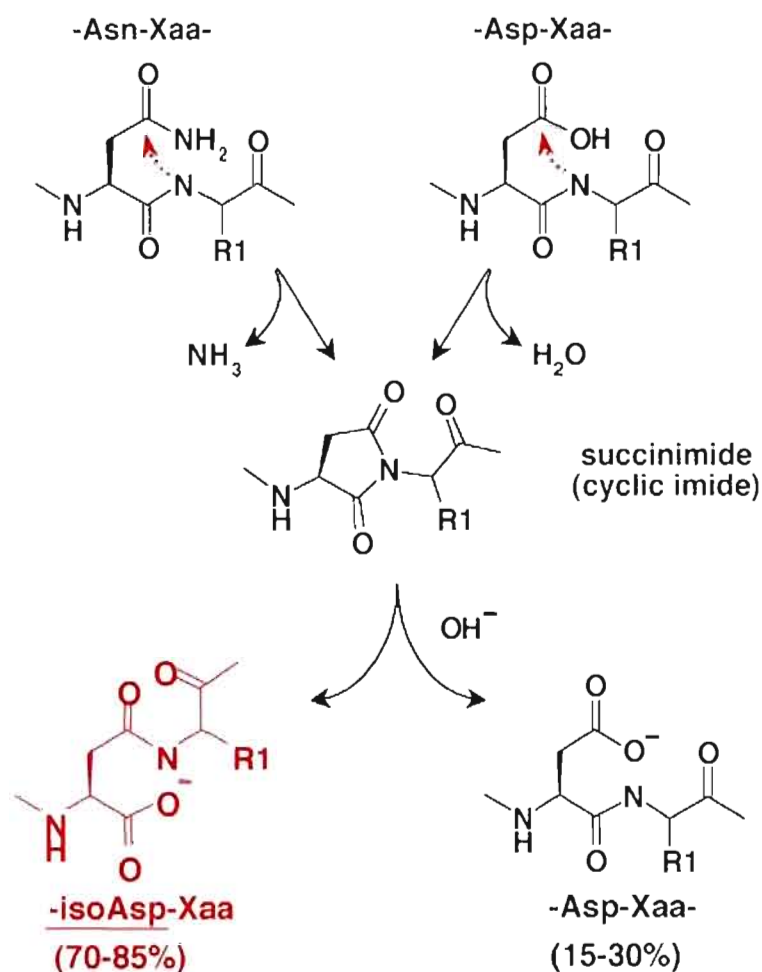


Figure 1.2 Mécanismes de formation des résidus isoaspartates (isoAsp) à partir des acides aminés asparagines (Asn) ou aspartates (Asp) (Tiré de Reissner K. J. et Aswad D.W., 2003)

La formation d'un résidu isoaspartate (isoAsp) se produit essentiellement en deux étapes (figure 1.2). Tout d'abord, on a la formation d'un intermédiaire L-succinimide. Cela se produit lorsque le lien peptidique du groupement α -aminé subit une attaque nucléophile du groupement carbonyle de la chaîne latérale. Il se produit alors une désamidation des asparagines et une déshydratation des acides aspartiques. L'intermédiaire succinimide ainsi formé est instable (demi-vie de 4 h à pH 7.4 et 37°C) et est rapidement hydrolysé en Asp (environ 30%) et isoAsp (environ 70 %) (Geiger et Clark S, 1987; Patel et Borchardt, 1990 ; Tyler-Cross et Schirch, 1991). La forme isoAsp est prédominante à cette

étape due à la structure asymétrique de l'intermédiaire succinimide (figure 1.2) (Brennan et Clarke, 1995).

Des études *in vitro* utilisant une grande variété de protéines et de peptides synthétiques ont permis d'établir des facteurs pouvant influencer la formation des résidus isoaspartates. Ainsi, la structure primaire d'une protéine joue un grand rôle dans le processus de désamidation. Par exemple, des résidus isoAsp sont formés dans des séquences où l'acide aminé qui suit l'asparagine est petit, hydrophile et ne possède pas une grande chaîne latérale (Johnson et Aswad, 1995). En effet, une glycine qui suit l'asparagine permettra l'isomérisation de l'asparagine 70 à 100 fois plus rapidement qu'un acide aminé hydrophobe (Brennan et Clarke, 1995). Ces études ont permis d'identifier trois acides aminés comme étant plus favorables à la formation des résidus isoaspartates, soit la glycine, la sérine et l'histidine. Ils accélèrent la formation de l'intermédiaire succinimide en favorisant la déprotonation de l'azote du lien peptidique favorisant ainsi l'attaque nucléophile de la chaîne latérale de l'aspartate ou l'asparagine (Reissner et Aswad, 2003). Fait intéressant, des études ont également permis d'établir que l'acide aminé précédant l'aspartate ou l'asparagine n'affectent pas la formation d'isoaspartates (Brennan et Clarke, 1995). Autre que la structure primaire de la protéine, la structure secondaire joue également un grand rôle dans la formation des résidus isoaspartates. Ainsi, la formation des résidus aspartates anormaux est plus susceptible de se produire dans une région flexible de la protéine d'une structure secondaire comme l'hélice α ou le feuillet β (Xie et Schowen, 1999). En effet, les régions flexibles d'une protéine permettent mieux la cyclisation et la formation de l'intermédiaire succinimide (Chazin et Kossiakoff, 1995).

1.2.4 Réparation des résidus aspartates anormaux par la PIMT

La formation de l'intermédiaire succinimide et par le même fait la formation des résidus isoaspartates est un phénomène spontané. Il ne constitue pas un problème en soi sauf dans le cas du vieillissement ou on observe une accumulation de protéines anormales. Cette accumulation altère la fonction biologique des protéines et peut engendrer des maladies. Une maladie typique associée à une accumulation de protéines anormales est la maladie d'Alzheimer (Clarke, 2003) où on y retrouve une accumulation accrue d'une protéine

agrégée et isomérisée, la protéine tau intracellulaire. Par sa capacité à réparer des protéines anormales en convertissant des résidus aspartates isomérisés en L-aspartates normaux, la PIMT est une enzyme importante pour réparer les protéines endommagées.

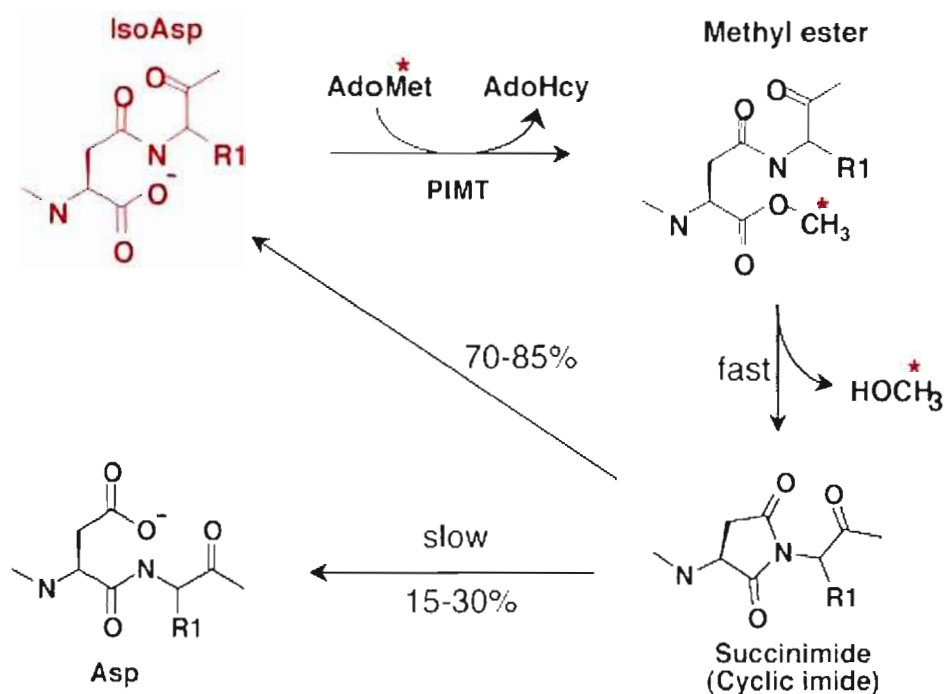


Figure 1.3 Mécanismes de réparation des résidus aspartates isomérisés par la PIMT (Tiré de Reissner K. J. et Aswad D.W., 2003)

Le mécanisme de conversion des résidus aspartates anormaux en L-aspartates par la PIMT est très bien documenté (figure 1.3). Cette conversion est dépendante du donneur de groupement méthyle, l'AdoMet. Par conséquent, cette réaction génère une molécule de l'AdoHcy (AdoHcy). En effet, la méthylation des résidus isoaspartates par la PIMT facilite la reformation de l'imide cyclique (succinimide) via la formation d'un méthyle ester. Le succinimide est alors hydrolysé en aspartate ou isoaspartate dans une proportion d'environ 30 % Asp et 70 % isoAsp (Geiger et Clarke, 1987; Stephenson et Clarke, 1989). C'est en perpétuant ce cycle que la PIMT transforme des résidus isoaspartates en résidus aspartates normaux. Même si ce mécanisme de conversion ne génère qu'environ 30 % de résidus aspartates réparés, il est relativement peu coûteux en énergie considérant un apport énergétique nécessaire à la dégradation des protéines endommagées et à la synthèse de

nouvelles protéines. Effectivement, la synthèse d'une protéine typique requiert des milliers de molécules d'ATP comparativement à environ l'équivalent de 10 molécules d'ATP sous forme d'AdoMet nécessaires à leur réparation (environ 10 cycles d'hydrolyse de succinimide) (Johnson et al., 1987).

La réparation des résidus L-isoaspartates a été démontrée *in vitro* avec des peptides synthétiques contenant des résidus aspartates isomérisés et des protéines vieilles (Johnson et al., 1987; McFadden et Clarke, 1987; Johnson, Langmack et Aswad, 1987). Ainsi, on a démontré que la réparation des résidus isoaspartates par la PIMT permet aux protéines de retrouver leur activité. C'est le cas de la calmoduline. Des études ont montré que la calmoduline peut perdre jusqu'à 82 % de sa capacité à activer une de ses protéines effectrices comme la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (Johnson, Freitag et Aswad, 1985). Cependant, ceci est réversible car une incubation avec la PIMT et l'AdoMet pendant 72 heures a permis de rétablir à 68 % la capacité de la calmoduline à activer la protéine kinase effectrice (Johnson, Langmack et Aswad, 1987).

1.2.5 Rôles et implications biologiques de la PIMT

Les rôles biologiques de la PIMT ont été démontrés à plusieurs niveaux. Tout d'abord, des études montrent qu'une accumulation importante des protéines endommagées contenant des résidus isoAsp anormaux nuit à la fonction de ces protéines et engendre dans certains cas des pathologies. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer qui se caractérise par une accumulation anormale de protéines ou ce qu'on appelle des plaques séniles. Ces plaques extracellulaires se forment dans les régions corticales du cerveau et dans les vaisseaux sanguins cérébraux (Mann, 1985). Les plaques séniles sont composées d'un peptide appelé β -amyloïde provenant de la protéolyse de la protéine APP (*amyloid precursor protein*). L'implication de la PIMT dans la maladie d'Alzheimer a déjà été étudiée. En effet, lorsque la protéine APP est clivée, il y a formation du peptide β -amyloïde, composé de 39 à 43 acides aminés, qui ensuite subit plusieurs modifications dont l'isomérisation des résidus isoaspartates (Shimizu et al., 2000). Une étude en particulier a montré que les acides aminés à la position 1 et 7 du peptide β -amyloïde peuvent subir une isomérisation pour donner des résidus L-isoaspartates et D-isoaspartates, dans des cerveaux atteints de la

maladie d'Alzheimer (Roher *et al.*, 1993). En 2005, l'équipe de Shimizu a démontrée une augmentation des résidus L-isoaspartates dans les peptides β -amyloïdes chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En effet, ils sont arrivés à la conclusion que l'isomérisation des aspartates en position 23 augmente fortement l'agglomération des peptides dans les plaques séniles (Shimizu *et al.*, 2005). Deux autres protéines jouent un rôle clef chez la maladie d'Alzheimer. Il s'agit des protéines tau et ubiquitine qui forment des plaques neurofibrillaires (PNF) dans le cytosol des neurones atteints (Mann, 1985). Des études ont démontrées que la protéine tau, isolée des cerveaux des patients atteints d'Alzheimer contient également des résidus aspartates isomérisés aux positions Asp-193, Asn-381 et Asp-387 comparativement à la protéine tau contrôle (Watanabe, Takio et Thara, 1999; Shimizu *et al.*, 2000). De plus, des études d'immunohistochimie ont démontré que la PIMT est plus fortement exprimée dans les régions du cerveau atteintes de la maladie, au sein des neurones et plus précisément des régions riches en plaques neurofibrillaires (PNF) (Shimizu *et al.*, 2000).

Cependant, ce sont des études menées sur des souris transgéniques déficientes en PIMT ($PIMT^{-/-}$) qui ont révélé le rôle physiologique de la PIMT. En effet, ces études ont permis de comprendre l'impact de la PIMT dans l'organisme et les conséquences engendrées par une accumulation accrue des protéines anormales. L'analyse des protéines du cytosol, des différents tissus des souris transgéniques, a montré un niveau de résidus isoaspartates 4 à 8 fois plus élevé comparativement aux souris sauvages (Wild type) (Kim *et al.*, 1997). Dans cette étude, plusieurs tissus ont été analysés et certains présentaient un niveau très élevé de protéines anormales contenant des résidus isoAsp dont le cœur, le foie, les érythrocytes et le cerveau. Mais, c'est surtout dans ce dernier qu'on observa un niveau drastique de protéines anormales (Kim *et al.*, 1997). Contrairement aux souris sauvages, les souris transgéniques présentaient plusieurs anomalies dont un retard significatif en terme de croissance et des convulsions fatales, typiques de l'épilepsie, observés à l'âge de 4 à 6 semaines. Des observations similaires ont été rapportées dans une autre étude utilisant des souris transgéniques dont la PIMT a été inhibée dans le cerveau (Yamamoto *et al.*, 1998). Comme dans l'étude de Kim *et al.*, 1997, les souris présentaient différentes anomalies neurologiques dont la mort engendrée par des convulsions à l'âge de 4 à 12 semaines. Ces deux études

montrent l'importance des protéines anormales contenant des résidus isoaspartates et le rôle critique de la PIMT dans le maintien du système nerveux central.

D'autres études effectuées sur des souris transgéniques déficientes en PIMT ont permises de solidifier l'hypothèse que la PIMT a une implication importante dans l'épilepsie. Ainsi, certaines études ont démontrées qu'un traitement avec des agents anticonvulsants comme l'acide valproïque et clonazepam permettent de diminuer la fréquence des convulsions et à prolonger l'espérance de vie des souris transgéniques de 4 à 5 semaines comparativement aux souris transgéniques n'ayant par reçu de traitement (Kim et al., 1999). De plus, lorsque ces souris ont été traitées avec l'acide valproïque uniquement, on a constaté chez eux une augmentation de la masse corporelle ce qui n'était pas observable chez les souris sauvages ayant reçu le même traitement. Cela suggère que la différence de masse corporelle entre les souris contrôles et les souris transgéniques PIMT^{-/-} est un facteur secondaire comparativement aux troubles neurologiques engendrées par une déficience en PIMT. D'autres études histologiques, comportementales et physiologiques ont permis de constater d'autres anomalies intéressantes chez les souris PIMT^{-/-}. Tout d'abord, les souris transgéniques ont en moyenne un cerveau 15 % plus large comparativement aux souris sauvages malgré leur taille et masse corporelle inférieure (Yamamoto et al., 1998). Également, chez ces mêmes souris on peut observer grâce aux coupes histologiques une morphologie dendritique anormale accompagnée d'une formation d'agglomération des nerfs.

Les rôles et implications biologiques de la PIMT semblent surtout importants pour le cerveau et le système nerveux central. Comme les études le démontrent, la PIMT pourrait être impliquée dans certaines maladies neurologiques comme l'Alzheimer et l'épilepsie. De plus, les études menées sur des souris PIMT^{-/-} démontrent les conséquences importantes pour le cerveau lorsque la PIMT est inhibé dans celui-ci.

1.3 Acide valproïque

1.3.1 Historique et propriétés

L'acide valproïque (acide 2-propylvalérique) (VPA) a été synthétisé pour la première fois par Burton en 1882 en temps qu'un analogue à l'acide valérique (figure 1.4). Pendant des décennies, l'acide valproïque a été utilisé comme un solvant organique et n'avait aucune utilisation pharmacologique.

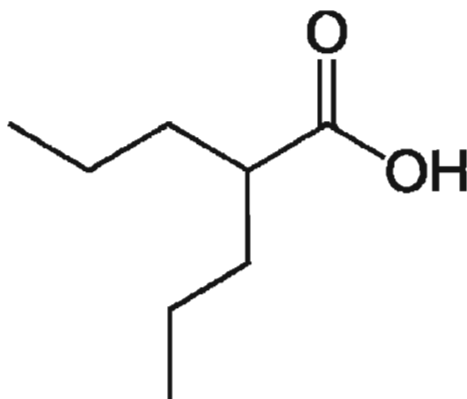


Figure 1.4 Structure chimique de l'acide valproïque

Ce n'est qu'en 1962 qu'un chercheur français nommé Pierre Eymard découvre que l'acide valproïque possède des propriétés anti-convulsantes. Les premiers essais cliniques utilisant l'acide valproïque sous sa forme de sel, le valproate, pour traiter l'épilepsie ont commencé en 1964 (Lebreton *et al.*, 1964). En 1967, le valproate a été commercialisé en France comme médicament anti-épileptique. Aujourd'hui, il est commercialisé dans plus de cent pays et est le médicament le plus communément prescrit pour traiter l'épilepsie. En effet, le VPA possède un large spectre d'activité ce qui lui permet de traiter plusieurs types de crises épileptiques partielles et généralisées et ce autant chez les adultes que chez les enfants (Perucca, 2002).

De plus, le VPA est utilisé pour traiter le désordre bipolaire car son mode d'action s'apparente à celui de lithium, qui est le médicament le plus prescrit pour traiter ce désordre. En effet, le VPA augmente le niveau cérébral d'acide γ -aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur qui inhibe la transmission synaptique, ce qui donne au VPA ses propriétés stabilisatrices de l'humeur (Johannessen, 2000). De plus, l'inhibition de la

neurotransmission GABAergique peut provoquer des convulsions, ce qui peut expliquer des propriétés anti-convulsantes que possède le VPA (Löscher, 1989).

1.3.2 Mécanismes d'induction de la PIMT par l'acide valproïque

Les mécanismes cellulaires qui participent à l'expression de la PIMT sont toujours mal connus. Cependant, dans les dernières années notre laboratoire a identifiée des voies de signalisation clefs nécessaires à son expression. Comme il a été démontré que la PIMT est impliqué chez l'épilepsie, il est nécessaire de comprendre comment des agents anti-convulsants comme le VPA influence l'expression de celle-ci et quels mécanismes cellulaires sont impliqués.

Notre laboratoire a déjà démontré que le VPA induit l'expression de la PIMT dans les astrocytomes U-87 MG et les neuroblastomes SH-SY5Y. En effet, une dose thérapeutique de 1 mM VPA induit l'expression de la PIMT d'environ 2 fois et ce seulement après 24 heures de traitement (Cournoyer et Desrosiers, 2009). De plus, le VPA influence différentes voies de signalisation comme les voies de ERK, GSK-3/ β -caténine, l'activité de la protéine kinase C et le métabolisme de l'inositole. La voie de signalisation ERK (extracellular-regulated kinase) joue un rôle clef dans la neurogenèse et la formation et la plasticité synaptique (Chen et Manji, 2006).

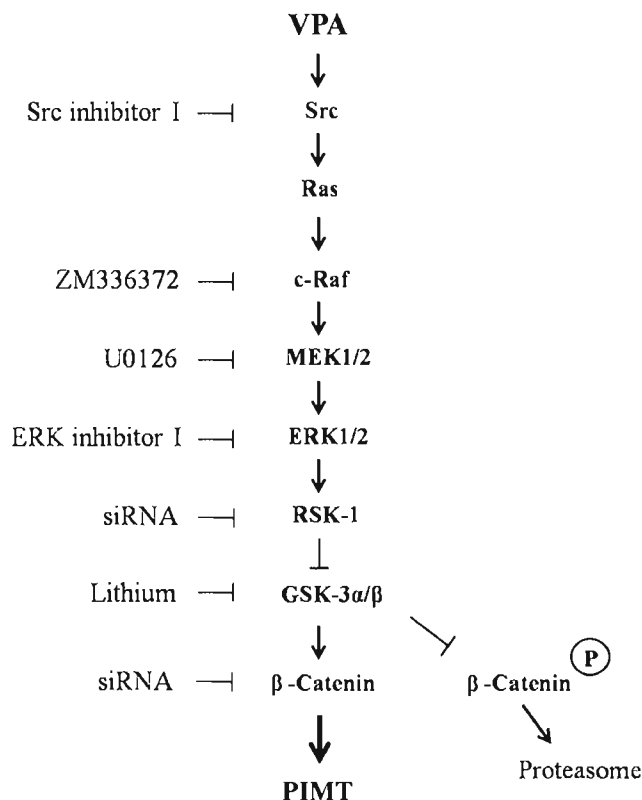


Figure 1.5 Représentation schématique des voies de signalisation responsables de l'induction de la PIMT par l'acide valproïque. (Tiré de Cournoyer et Desrosiers, 2009)

Deux études en particulier réalisées par notre laboratoire ont démontrées que l'induction de la PIMT par VPA nécessite l'activation de la voie de signalisation de ERK et la stabilisation de la protéine β -caténine (figure 1.5) (Cournoyer et Desrosiers, 2009; Lamarre et Desrosiers 2008). De plus, on constate que la phosphorylation et par le même fait l'inhibition de la GSK-3 est nécessaire à ce processus car la protéine β -caténine est dégradée au niveau des protéasomes lorsque GSK-3 demeure active. Fait intéressant, le lithium qui est utilisé dans le traitement du désordre bipolaire, induit d'environ deux fois l'expression de la PIMT dans les astrocytomes U-87 MG car il permet l'inhibition de la protéine GSK-3 (Lamarre et Desrosiers 2008). Cela supporte le lien entre le lithium et le VPA et leur capacité à traiter le désordre bipolaire.

Une autre voie de signalisation qui est activé par VPA est la voie de PI3K/Akt (Sarno et al., 2002). Cette voie de signalisation est connue pour son implication dans la prolifération et la survie cellulaire (Datta et al., 1999; Brazil et Hemmings, 2001; Brunet et al., 2001).

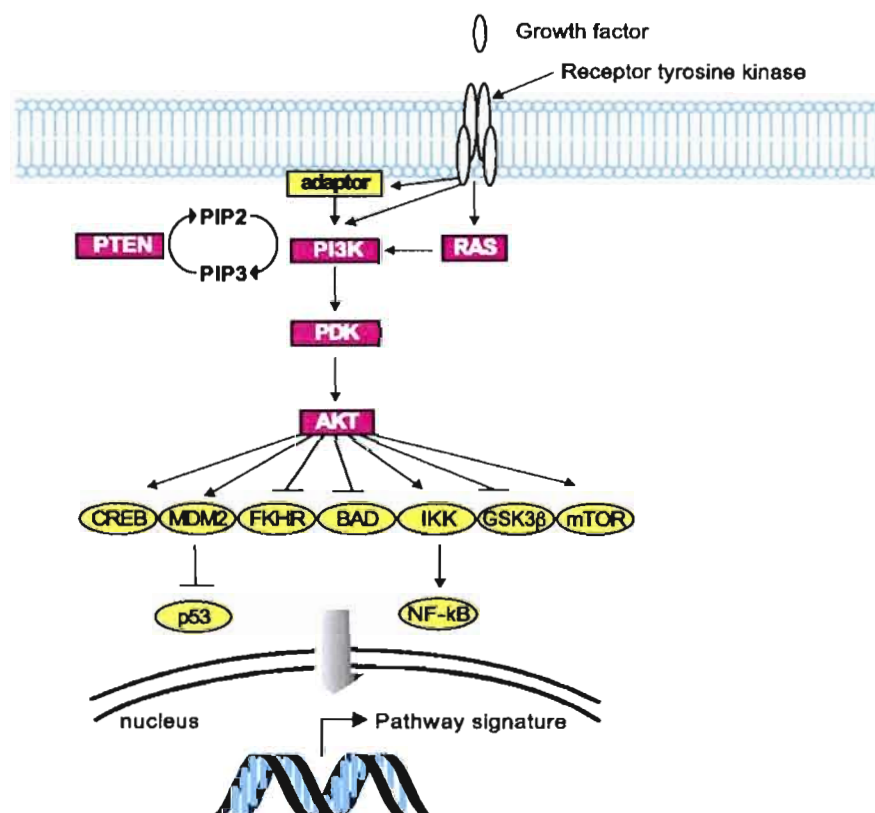


Figure 1.6 Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/Akt (Tiré de Watters et Roberts, 2006)

La voie de signalisation PI3K/Akt dépend de l'activation de la protéine PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinases). Les kinases de cette famille sont recrutées au niveau de la membrane plasmique et elles utilisent comme substrat le PtdIns(4,5)P2 (PIP2) qu'elles transforment en PtdIns(3,4,5)P3 (PIP3) (figure I.6). L'augmentation de la concentration de PIP3 au niveau de la membrane cellulaire permet le recrutement de nouvelles protéines comme la PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1). L'activation de cette kinase dépend de PIP3. Lorsque PDK1 est active elle phosphoryle la kinase Akt sur deux sites, soit la sérine 473 et de la thréonine 308. Activée, la protéine Akt peut ensuite

phosphoryler ses protéines effectrices et permettre ainsi la synthèse du glycogène, la synthèse protéique, l'expression génique, la prolifération et la survie cellulaire (figure 1.6).

Dans la littérature la voie de signalisation PI3K/Akt n'a jamais été rapportée dans l'activation de la PIMT, cependant des études montrent que le VPA stimule cette voie de signalisation et que possiblement elle pourrait participer dans l'expression de la PIMT (Sarno et al., 2002). De plus, la même étude montre que VPA inhibe indirectement la protéine GSK-3 en activant Akt ce qui suggère que PIMT pourrait être induite lorsque cette voie est stimulée. Finalement, notre laboratoire a déjà démontré que l'inhibition directe de GSK-3 par le lithium à des doses cliniques augmente l'expression de la PIMT in vitro (Lamarre et Desrosiers 2008). Alors, la question qui se pose est la suivante : est-ce que l'acide valproïque induit l'expression de la PIMT via la voie de signalisation PI3K/Akt ?

Il est également connu dans la littérature que la voie de signalisation PI3K/Akt active le facteur de transcription CREB (figure 1.7) (Du et Montminy, 1998). De plus, l'étude du promoteur de la PIMT a permis d'identifier plusieurs séquences consensus CRE (*cyclic AMP response element*), sites de liaison du facteur de transcription CREB à l'ADN (DeVry, Tsai et Clarke, 1996).

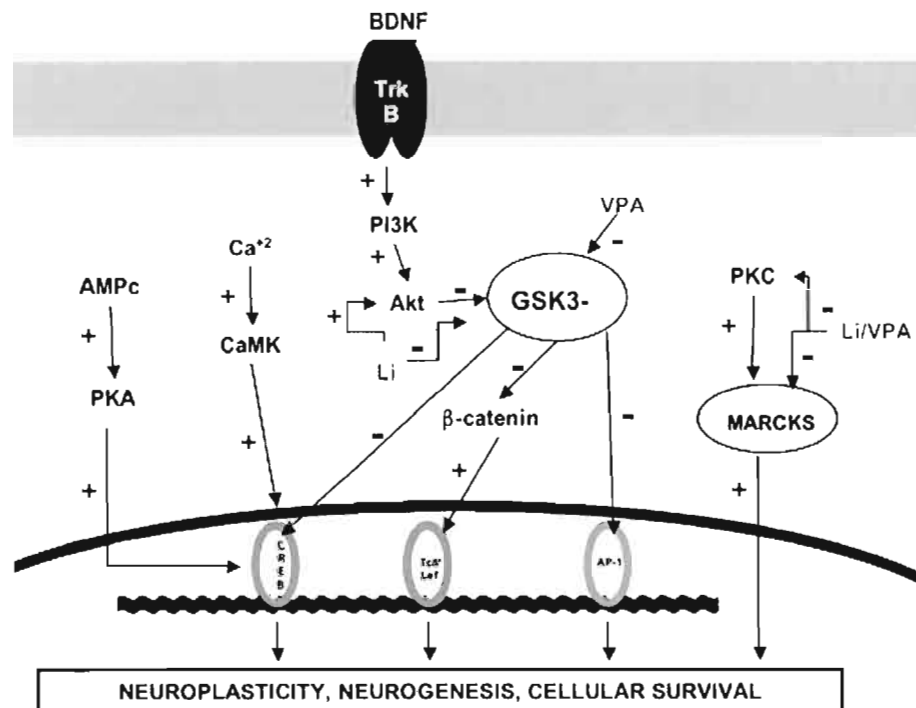


Figure 1.7 L'inhibition de GSK-3 permet l'activation du facteur de transcription CREB (Tiré de Frey et al., 2004)

L'implication de ce facteur de transcription a été surtout étudiée au niveau du cerveau. Ainsi il a été démontré qu'il est important pour la mémoire à long terme (Bourtchuladze et al., 1994). L'inhibition de la protéine GSK-3 par le lithium et le VPA permet l'activation de CREB (Frey et al., 2004). Donc, dans notre étude nous allons examiner l'implication de ce facteur de transcription dans l'expression de la PIMT induite par VPA.

1.4 Objectifs de la recherche

Depuis sa découverte en 1965, d'innombrables études ont permis d'élucider les rôles et les fonctions biologiques de la PIMT. L'implication de la PIMT dans le développement et le maintien du système nerveux central a été clairement établie. De plus, sa fonction en tant que protéine réparatrice s'est avérée primordiale surtout au niveau du cerveau et son implication dans l'épilepsie et autres maladies neurodégénératives en font un sujet de

recherche particulièrement intéressant (Kim et al., 1997 ; Yamamoto et al., 1998 ; Kim et al., 1999 ; Shimizu et al. 2005). Même si son mécanisme d'action est aujourd'hui bien établi, les voies de signalisation qui régulent l'expression et l'activité de la PIMT demeurent encore peu connues. Donc, il est primordial d'identifier ces voies de signalisation afin de mieux comprendre les rôles biologiques de la PIMT mais aussi pour identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'épilepsie et autres maladies neurodégénératives. Des recherches effectuées par notre laboratoire ont déjà démontré l'implication de la kinase GSK-3 dans la régulation de la PIMT lorsque cette dernière est induite par l'acide valproïque ou le lithium. C'est pour cette raison que l'objectif de la présente étude a été d'analyser la contribution de la voie de signalisation PI3K/Akt dans l'induction de la PIMT par l'acide valproïque. Notre recherche a été effectuée sur des cellules cancéreuses du cerveau soit les neuroblastomes SH-SY5Y qui présentent une forte concentration en PIMT. Le traitement de ces cellules avec des inhibiteurs pharmacologiques et génétiques de la voie de signalisation PI3K/Akt a démontré que l'induction de la PIMT par l'acide valproïque est atténuée lorsque cette voie est bloquée. Nos résultats suggèrent que la voie de signalisation PI3K/Akt/GSK-3 participe à l'expression de la PIMT lorsqu'elle est induite par VPA.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

La lignée cellulaire de neuroblastomes humains SHSY5Y a été obtenue de l'American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, États-Unis). L'acide valproïque provient de Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Les inhibiteurs de PI3K, wortmannin et LY294002 proviennent de Calbiochem (San Diego, CA, États-Unis). Les siRNA contre Akt1/2 et CREB-1 ont été achetés de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, États-Unis). Le siRNA contrôle négatif est de Qiagen (Valencia, CA, États-Unis). L'agent de transfection lipofectamine 2000, servant à transfecter les cellules avec les siRNA, provient d'Invitrogen (Burlington, ON, Canada). L'anticorps polyclonal contre la PIMT a été produit par l'Institut de recherche en biotechnologie (Montréal, QC, Canada). L'anticorps polyclonal α -tubuline provient de Santa Cruz Biotechnology. Les anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement Akt1, phospho-Akt (Thr308), CREB, phospho-CREB (Ser133) et GSK-3- α/β ont été obtenus de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, États-Unis). L'anticorps contre Phospho-GSK-3- α (Ser21) a été acheté de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, États-Unis). Pour les tests d'activité enzymatiques, le Delta-Sleep-Inducing peptide (DSIP-isoD) provient de Calbiochem. La S-adénosyl-L-homocystéine et S-adénosyl-L-méthionine proviennent de Sigma. [^3H]AdoMet provient de Dupont-New England Nuclear (Boston, MA, États-Unis).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire de neuroblastomes SH-SY5Y a été maintenue dans le milieu D-MEM/F-12 (Invitrogen) avec un ajout de 10% de sérum bovin fœtale (FBS).

2.2.2 Traitement des cellules avec les inhibiteurs pharmacologiques

Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée de 5% CO₂ à 37°C. Tous les traitements se faisaient dans des plaques de 6 puits (34,8 cm de diamètre). Les cellules SH-SY5Y étaient ensemencées à une concentration de 200 000 cellules par puit pendant 48 heures dans du milieu de culture avec 10% sérum. Ensuite, le VPA et les inhibiteurs pharmacologiques étaient ajoutés aux cellules durant 24 h comme décrit dans les légendes de figures. Lorsque le DMSO a été utilisé comme véhicule, sa concentration a été maintenue à 0,1% (v/v). Suite à l'incubation des cellules pour les différents traitements, les cellules ont été lysées et l'expression de leurs protéines a été vérifiée par l'immunobuvardage de type Western.

2.2.3 Transfection des cellules avec un siRNA contre Akt1

Les cellules SH-SY5Y ont été ensemencées dans des plaques de 6 puits à une concentration de 400 000 cellules par puit et dans le milieu D-MEM/F-12 avec 10% sérum. Après 24 h, le milieu de culture est changé pour un milieu sans sérum. Avant de commencer la transfection, on prépare une solution de milieu sans sérum contenant l'agent de transfection (lipofectamine 2000) à 20 ug/ml et le siRNA contre Akt1 à 50 nM. De même manière, on prépare le siRNA contrôle négatif. On incube cette solution pendant 45 min à la température de la pièce avant de l'ajouter aux cellules. La transfection se fait dans l'incubateur à 37°C pendant 4-6 h. Après cette période, on remplace le milieu de culture avec un milieu frais contenant du sérum et on laisse incuber pendant 24 h à 37°C.

2.2.4 Lyse cellulaire

Après les traitements, les cellules sont lavées avec une solution froide de phosphate saline tamponnée (PBS). Ensuite, les cellules sont lysées sur glace pendant 30 minutes avec le tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate) contenant 1 mM fluorure de sodium (NaF), 1 mM de vanadate de sodium (Na_3VO_4) pour inhiber les phosphatases et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les débris cellulaires sont exclus par une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min.

2.2.5 Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type western

Les protéines provenant des lysats cellulaires ont été dosées par la méthode de micro-BCA (Pierce, Rockford, IL, États-Unis). Par la suite, 20 µg de protéines ont été mélangés avec un tampon échantillon d'électrophorèse (62,5 mM TrisHCl pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS, 5% β -mercaptoéthanol et 0,00625% bleu de bromophénol) et chauffés pendant 4 minutes à 100°C. Les échantillons ainsi préparés ont été déposés sur un gel d'entassement 3,8 % (p/v) acrylamide et 0,1% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (v/v) de SDS, 1 µl/ml de N,N,N',N-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml persulfate d'ammonium (APS). Les protéines ont été séparées dans un gel de séparation contenant 12,5% (p/v) d'acrylamide et 0,3 % (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,375 M de TrisHCl à pH 8,8, 0,1 % (v/v) de SDS, 0,5 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. La migration des protéines s'est effectuée à 100 volts pendant 15 minutes et 150 volts pendant 75 minutes.

Suite à l'électrophorèse, les gels de polyacrylamide contenant les protéines et les membranes de polyvinylidène difluorure (PVDF) ont été placés dans un tampon de transfert (96 mM glycine, 10 mM Tris et 10% méthanol) pendant 15 minutes. Les transferts des protéines sur les membranes de PVDF sont effectués à 14 volts et 80 mA pendant 45 minutes dans le tampon de transfert. Afin d'effectuer le blocage des sites de liaison non spécifiques des membranes de PVDF, elles ont été incubées à température pièce pendant 1 heure dans un tampon Tris salin (TBS) (150 mM NaCl et 20 mM Tris/HCl pH 7,5) contenant 0,1 % de Tween-20 et 5% de lait en poudre.

2.2.6 Immunodétection

Suite au blocage, les membranes de PVDF ont subi trois lavages de 15 minutes dans un tampon TBS contenant 0,3 % de Tween-20. Par la suite, les membranes de PVDF ont été incubées pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire approprié. Les anticorps primaires ont été dilués dans le tampon TBS contenant 0,1 % de Tween-20, 5 % d'albumine de sérum bovin (BSA) et 0,01 % de sodium azide (NaN₃). Dans le cas de l'anticorps contre la PIMT, le BSA a été omis. Voici les différentes dilutions d'anticorps : PIMT 1:50 000, Akt1, phospho-Akt1, GSK-3- α/β , phospho-GSK-3- α , α -tubuline et CREB 1:1000 et phospho-CREB 1:500. Suite à l'incubation des membranes de PVDF avec l'anticorps primaire, on a effectué trois autres lavages de 15 minutes avec le tampon TBS contenant 0,3% Tween-20. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 heure à température pièce avec l'anticorps secondaire de lapin couplé à la peroxydase. L'anticorps secondaire est préparé à une dilution de 1:2500 dans le tampon TBS contenant 0,1 % Tween-20 et 5 % de lait en poudre. Par la suite, on a effectué trois autres lavages avec le tampon TBS contenant 0,3% Tween-20 afin d'enlever toute trace d'anticorps secondaire. La prochaine étape consistait à obtenir un signal de chimioluminescence (ECL) en incubant les membranes de PVDF dans une solution ECL pendant une minute. Ensuite, les membranes ont été exposées en présence de films Fuji pour la détection des protéines d'intérêt. L'analyse de l'intensité relative des différentes protéines détectées sur les autoradiogrammes a été effectuée à l'aide d'un logiciel de densitométrie TotalLab (Dynamique non linéaire, Durham, NC, États-Unis) intégré à un système d'imagerie numérique.

2.2.7 Activité méthyltransférase

Les protéines provenant des lysats cellulaires ont été dosées comme décrit préalablement. Pour chaque essai d'activité carboxyméthyltransférase de la PIMT, 10 μ g de protéines ont été utilisés et préparés dans une solution contenant 100 mM Hepes-Tris pH 7,0, 50 μ M (2 μ Ci) [³H]AdoMet et 1 mM DSIP-isoD lequel servant de substrat pour la PIMT dans un volume final de 30 μ L. La réaction méthyltransférase s'est effectuée à 37°C pendant 1 heure. L'AdoHcy à une concentration finale de 5 mM, a été ajouté afin d'arrêter la réaction. L'incorporation de la radioactivité dans le peptide DSIP-isoD a été mesurée en

hydrolysant les groupements méthyls esters et en utilisant la méthode de phase vapeur en équilibre décrite précédemment (Lanthier *et al.*, 2002).

2.2.8 Analyses statistiques

Les analyses densitométriques ont été effectuées par le logiciel TotalLab (Dynamique non linéaire, Durham, NC, États-Unis). Pour la réalisation des figures, le logiciel Microsoft Office Excel 2003 a été utilisé. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Récemment des travaux dans notre laboratoire ont démontré que VPA, un médicament stabilisateur de l'humeur et un agent anticonvulsant, induit l'expression de la PIMT à des doses thérapeutiques dans les glioblastomes U-87 MG et les neuroblastomes SH-SY5Y (Lamarre et Desrosiers, 2008. Cournoyer et Desrosiers, 2009). Cependant, les voies de signalisation qui contrôlent cette expression restent mal connues. Notre laboratoire a démontré que l'inhibition de la protéine GSK-3 et la stabilisation de la β -caténine participent à l'expression de la PIMT lorsque induite par VPA (Lamarre et Desrosiers, 2008). De la même manière, la voie de signalisation de ERK participe à l'expression de la PIMT lorsque induite par VPA (Cournoyer et Desrosiers, 2009).

3.1 Stimulation de l'expression de la PIMT en présence du VPA

Afin d'étudier des nouvelles voies de signalisation participant à l'expression de la PIMT induite par VPA, nous avons au préalable optimisé les conditions de traitements en variant les concentrations de VPA ainsi que la durée du traitement. Les analyses d'immunobuvardage de type Western démontrent que l'expression de la PIMT augmente selon le temps d'incubation en présence de VPA (figure 3.1). Cependant, l'induction se stabilise après 24 heures d'incubation et ce dans le cas d'une dose thérapeutique de 1 mM VPA et une dose cinq fois plus élevée de 5 mM (figure 3.1). L'expression de l' α -tubuline, utilisée comme un contrôle négatif, est restée stable et ce pour toutes les périodes d'induction autant chez les cellules contrôles que les cellules traitées au VPA. Ces résultats démontrent que le VPA induit une expression accrue de la PIMT à une dose de 5 mM comparativement à une dose thérapeutique de 1 mM et que cette induction atteint son maximum à 24 heures d'incubation. Ainsi, 5 mM VPA induit l'expression de la PIMT d'environ 2,5 fois comparativement à environ 2 fois avec une dose de 1 mM. Pour la suite de notre étude, nous allons travailler avec ces conditions soit un traitement de 24 h à une dose de 5 mM VPA.

3.2 Le VPA augmente l'activité méthyltransférase de la PIMT dans les cellules SH-SY5Y.

Afin de confirmer que la PIMT induite en présence de le VPA est fonctionnelle, nous avons effectué un essai de carboxylméthylation. Un peptide synthétique, le DSIP-isoD contenant un résidu L-isoaspartyl dans sa séquence, a été utilisé comme substrat pour la PIMT. Les cellules ont été traitées avec le VPA puis l'activité de la PIMT a été mesurée par l'incorporation de la radioactivité dans le peptide DSIP-isoD (Lanthier et al., 2002). Les résultats démontrent que 5 mM VPA augmente l'activité de la PIMT d'environ 2 fois après 24 h de traitement (figure 3.2). L'augmentation de l'activité de la PIMT est également significative (1,6 fois) chez les cellules traitées avec une concentration de 1 mM VPA. Ces résultats supportent les observations de la figure 3.1 et démontrent que non seulement l'expression de la PIMT augmente en présence de VPA mais également son activité.

3.3 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA est dépendante de la voie PI3K

Plusieurs études ont montré que le VPA induit l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt chez les cellules neuronales (Sarno et al., 2002). Cette activation est observée par la phosphorylation de la protéine Akt et il est clairement établi que la phosphorylation d'Akt découle directement d'une activation de la protéine PI3K (Persad et al., 2001).

Afin de vérifier l'implication possible de la protéine PI3K dans l'induction de l'expression de la PIMT par VPA, nous avons inhibée la protéine PI3K avec deux inhibiteurs pharmacologiques soit la wortmannine et le LY294002. Tout d'abord, on constate une augmentation dans l'expression de la PIMT (environ 2 fois) lorsque les cellules sont incubées en présence de 5 mM VPA pendant 24 h comparativement aux cellules contrôles (figure 3.3 A et B). De plus, on observe une augmentation dans la phosphorylation d'Akt1 en présence de VPA comme révélé par l'immunodétection avec l'anticorps phospho-Akt (Thr308) (figure 3.3 A). Lorsque les cellules sont pré-incubées avec la wortmannine et l'agent LY294002, l'induction de la PIMT par VPA est moindre. L'effet est surtout significatif dans le cas de l'inhibiteur LY294002 qui prévient totalement l'induction de la PIMT par VPA (figure 3.3 B). Comme attendu, cette diminution dans l'induction de la PIMT se caractérise également par une baisse dans la phosphorylation

d'Akt1. Il est important de noter que la quantité d'Akt 1, utilisé comme un contrôle de charge, reste stable. Une analyse densitométrique d'Akt 1 n'a démontré aucune variation significative de cette protéine pouvant influencer les niveaux de la PIMT (données absentes). (figure 3.3 A).

Tel qu'en témoigne la figure 3.3, une inhibition de la kinase PI3K par wortmannine et surtout l'agent LY294002 résulte en une baisse dans l'expression de la PIMT induite par VPA. Il est également important de noter que l'expression basale de la PIMT n'est pas affectée par les inhibiteurs de PI3K. Donc, cette expérience démontre que la protéine PI3K joue un rôle clef dans l'expression de la PIMT lorsque celle-ci est induite par le VPA.

3.4 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA est dépendante de la kinase Akt.

La protéine Akt est activée en étant phosphorylée sur deux sites soit la sérine 473 ou la thréonine 308 (Persad et al., 2001). Comme Akt1 est fortement phosphorylée dans les cellules SH-SY5Y incubées en présence de VPA (figure 3.3 A) et que Akt est activée par PI3K, cela suggère que Akt participe potentiellement à l'expression de la PIMT. Afin d'examiner cette possibilité, nous avons inhibé la protéine Akt avec un siRNA dirigé contre Akt1.

Des essais préliminaires nous ont permis d'établir des concentrations optimales de siRNA nécessaires à l'inhibition d'Akt1 (résultats non montrés). Encore une fois, les cellules ont été mises en présence de VPA et pour cette expérience nous avons deux contrôles. Un premier contrôle est un groupe de cellules traitées uniquement avec 5 mM VPA durant 24 h qui a été comparé au groupe de cellules n'ayant reçu aucun traitement. Un deuxième contrôle est un groupe de cellules traitées avec VPA mais aussi avec un siRNA contrôle négatif.

Tout d'abord, on constate une augmentation de l'expression de la PIMT lorsque les cellules sont incubées en présence de VPA (environ 2.5 fois) (figure 3.4 A et B). Cette induction est également similaire pour les lysats des cellules transfectées avec le siRNA contrôle (figure 3.4 A et B). C'est un résultat attendu car cet siRNA n'est spécifique à

aucun ARN messager cellulaire et par conséquent n'affecte pas l'expression protéique dans les cellules. Dans le cas des cellules transfectées avec le siRNA spécifique à Akt, l'induction de la PIMT par VPA est diminuée d'une façon significative comparativement aux cellules induites et transfectées par le siRNA contrôle (figure 3.4 A et B). De plus, la détection de la protéine Akt1 avec un anticorps spécifique (figure 3.4 A) permet de constater l'inhibition de cette protéine avec le siRNA contre Akt. Dans cette expérience, nous avons utilisé l' α -tubuline comme contrôle afin de s'assurer des quantités égales des protéines analysées par SDS-PAGE (figure 3.4 A). Donc, cette expérience nous permet de conclure que la protéine Akt1 est nécessaire dans l'expression de la PIMT induite par VPA.

3.5 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA est dépendante de la kinase GSK-3

La protéine GSK-3 est phosphorylée et inactivée par la kinase Akt (Sarno et al., 2002). Comme nous avons déjà démontré que l'activation d'Akt1 joue un rôle important dans l'expression de la PIMT lorsque celle-ci est induite par VPA (figure 3.4), nous avons décidé d'inhiber GSK-3 afin de vérifier son implication dans le processus d'expression de la PIMT. Pour ce faire, nous avons inhibé GSK-3 avec le lithium qui est un inhibiteur direct de la kinase (Jope, 2003). Les cellules SH-SY5Y ont été incubées en présence de 5 mM VPA ou de 5 mM lithium pendant 24 heures. L'expression de la PIMT de ces deux groupes de cellules a été comparée à un groupe témoin n'ayant reçu aucun traitement. Selon la figure 3.5 A, le VPA ainsi que le lithium induisent tout les deux l'expression de la PIMT comparativement au groupe contrôle. Les analyses densitométriques (figure 3.5 B) montrent une induction de la PIMT par VPA d'environ 2 fois et 1.6 fois pour le lithium. On constate également, grâce à l'anticorps phospho-GSK-3- α reconnaissant la Ser21 phosphorylée (figure 3.5 A), une augmentation dans la phosphorylation de la protéine GSK-3- α lorsque les cellules sont exposées au VPA ou au lithium. Nous avons également détecté la protéine GSK-3- α/β totale pour s'assurer de la distribution égale des protéines séparées par SDS-PAGE (figure 3.5 A).

Comme le lithium inhibe la kinase GSK-3 directement en compétitionnant pour la liaison du Mg^{+} (Ryves et Harwood, 2001) et permet ainsi une augmentation dans l'expression de la PIMT, les résultats avec VPA suggèrent que ce médicament inhibe GSK-3 indirectement en

activant la voie de signalisation PI3K/Akt et ainsi augmente l'expression de la PIMT dans les cellules SH-SY5Y. Ces résultats démontrent que la phosphorylation, donc l'inhibition, de la kinase GSK-3 est primordiale pour une induction de la PIMT par VPA.

3.6 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA ne dépend pas du facteur de transcription CREB

Le facteur de transcription CREB est activé par la voie de signalisation PI3K/Akt (figure 1.7)(Du et Montminy, 1998). De plus, le promoteur de la PIMT contient plusieurs séquences CRE (*cyclic AMP response element*) potentielle qui permettent la liaison de facteur de transcription CREB (DeVry, Tsai et Clarke, 1996). Alors, nous avons voulu vérifier si le VPA induit l'expression de la PIMT via ce facteur de transcription.

Encore une fois, nous avons décidé d'inhiber la protéine d'intérêt. Pour ce faire, nous avons utilisé un siRNA qui a été dirigé contre CREB. Nous avons effectué des expériences préliminaires afin de trouver la concentration de siRNA optimale à l'inhibition de CREB (résultats non montrés). Ainsi, nous avons déterminé qu'une concentration de 40 nM de siRNA contre CREB pendant 48 heures était idéale à l'inhibition de celle-ci dans les cellules SH-SY5Y (figure 3.6). De plus, comme avec l'inhibition d'Akt, nous avons eu deux contrôles. Le premier contrôle est un groupe de cellules qui a été incubé pendant 48 heures uniquement avec de la lipofectamine et un second groupe de cellules qui a été transfecté avec un siRNA contrôle à 40 nM.

La détection des protéines PIMT et CREB par immunobuvardage de type Western, nous a permis de constater que l'induction de la PIMT par VPA ne semble pas être dépendante du facteur de transcription CREB. En effet, selon la figure 3.6 on constate que le VPA induit l'expression de la PIMT mais que cette induction reste stable malgré une forte inhibition du facteur de transcription CREB. Nous avons effectué cette expérience à 4 reprises avec toujours le même résultat. Alors, nous avons conclu de ces résultats que l'induction de l'expression de la PIMT par VPA était indépendante de l'activation du facteur de transcription CREB.

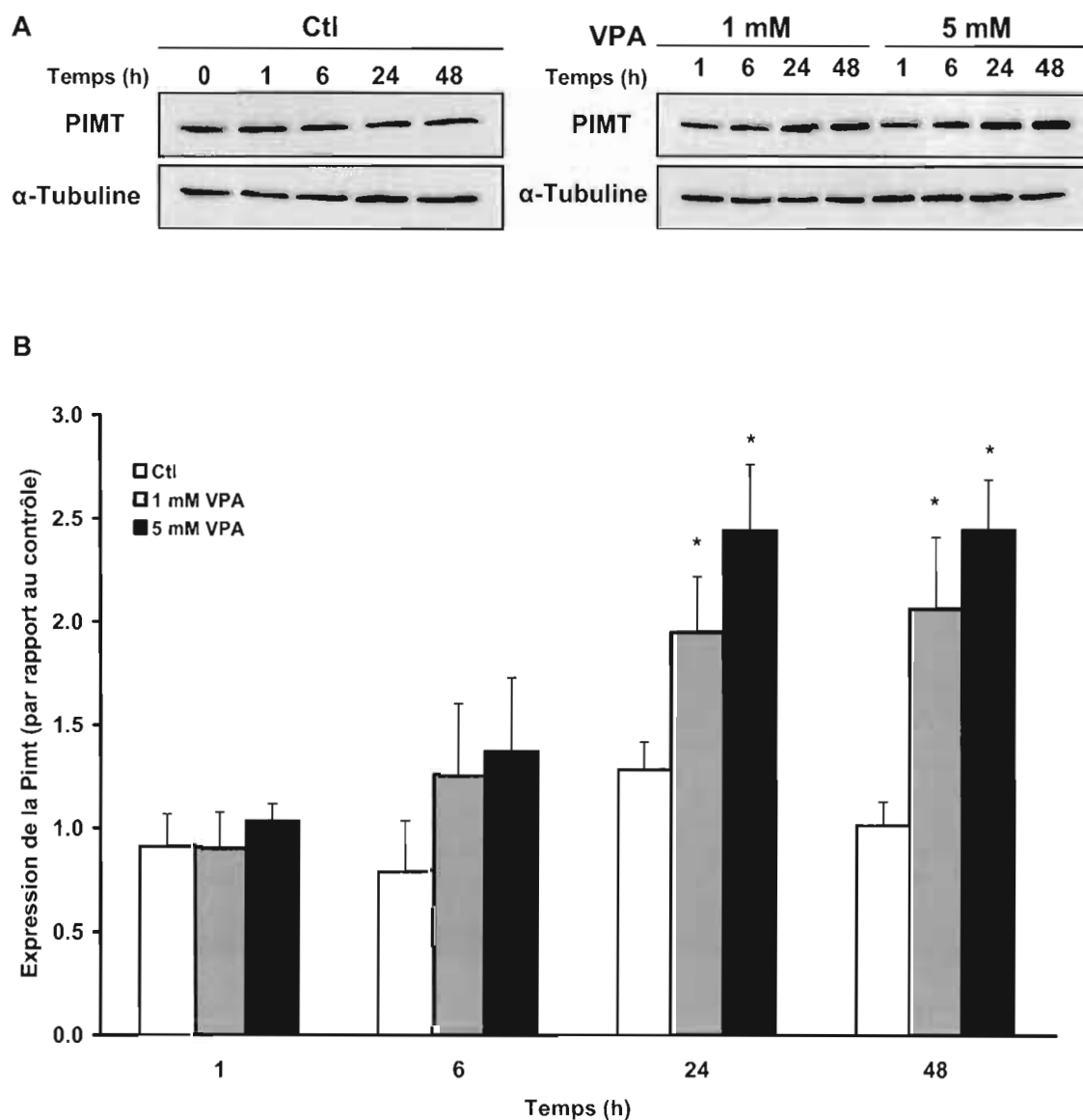


Figure 3.1 Cinétique de l'expression de la PIMT en présence de l'acide valproïque. Les cellules SH-SY5Y ont été incubées avec ou sans (Ctl) 1 mM VPA et 5 mM VPA pour une période de temps variant entre 0 et 48 heures. **(A)** L'expression de la PIMT et de l' α -tubuline des lysats cellulaires a été analysée par SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western. **(B)** Les histogrammes représentent l'expression de la PIMT dans les cellules traitées avec deux concentrations de VPA, soit la dose thérapeutique de 1 mM et une dose supérieure de 5 mM, comparativement aux cellules non traitées. Le rapport de la PIMT sur l' α -tubuline a été calculé suite à l'analyse densitométrique des protéines immunodétectées. Les résultats sont une moyenne de trois expériences indépendantes et \pm l'écart type. Le student's t test indique une différence significative (* $p < 0.05$) entre les cellules contrôles et les cellules traitées.

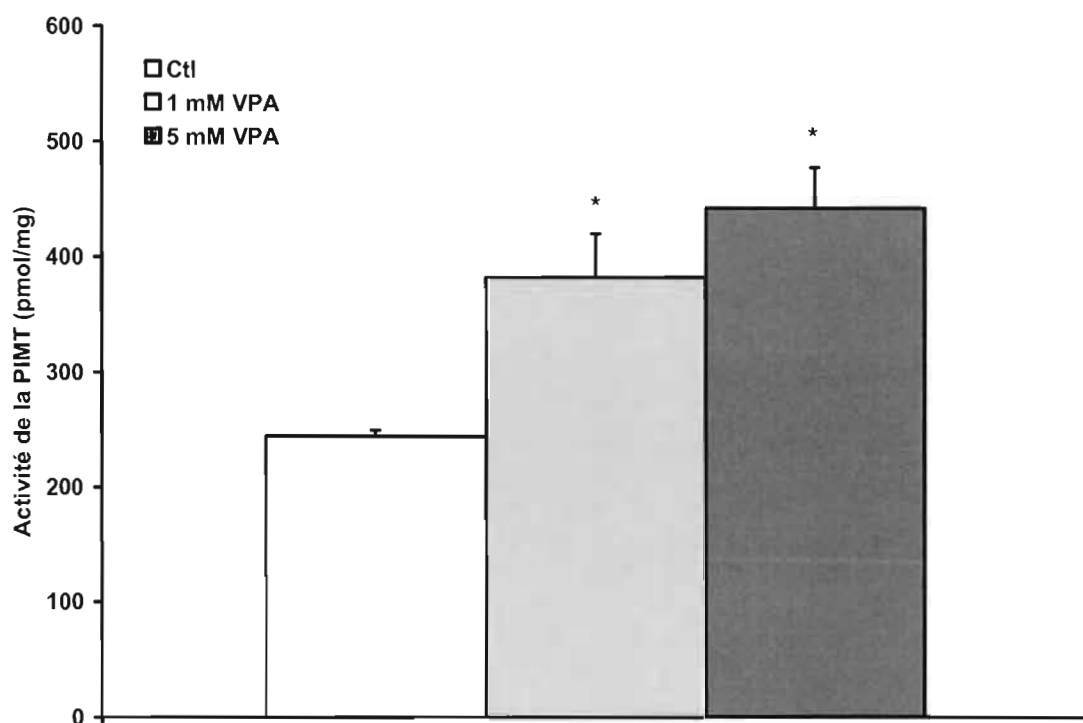
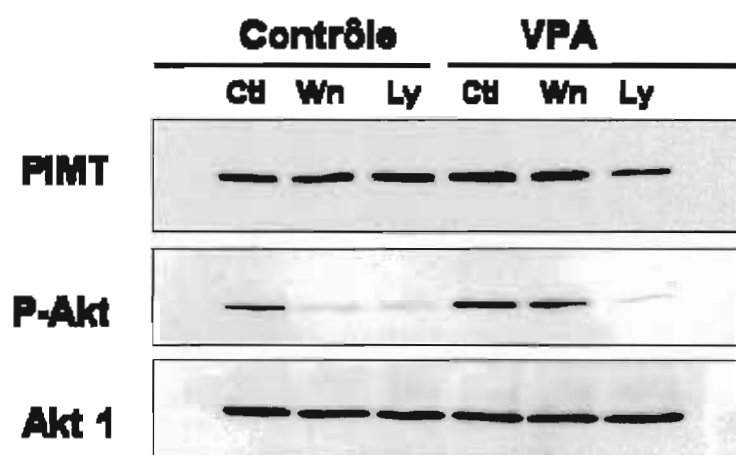


Figure 3.2 L'acide valproïque augmente l'activité méthyltransférase de la PIMT dans les cellules SH-SY5Y. Pour mesurer l'activité de la PIMT, les lysats cellulaires des cellules non traitées (Ctl) et des cellules traitées avec 1 mM et 5 mM VPA ont été utilisés. L'incorporation de groupements méthyles provenant du donneur [^3H]AdoMet dans le substrat DSIP-isoD a été mesurée par la méthode de diffusion du méthanol radioactif. Les résultats sont représentatifs de quatre expériences indépendantes. Chaque colonne représente la moyenne de quatre expériences \pm l'écart type. Le student's t test indique une différence significative (* $p < 0.05$) entre les cellules contrôles et les cellules traitées.

A



B

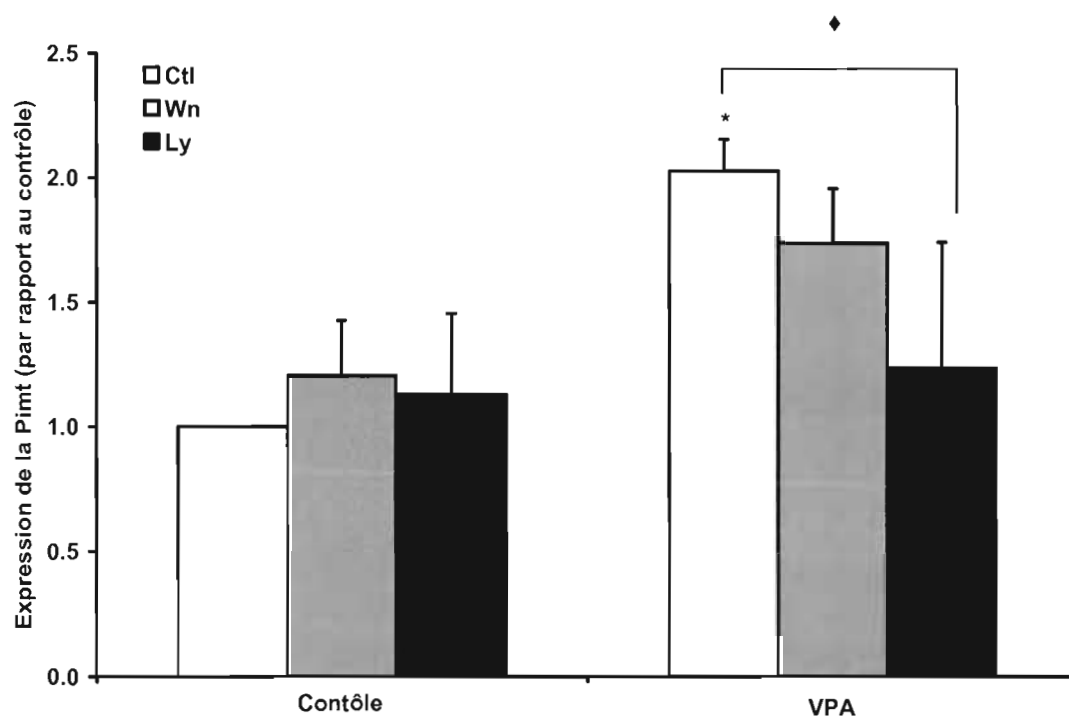
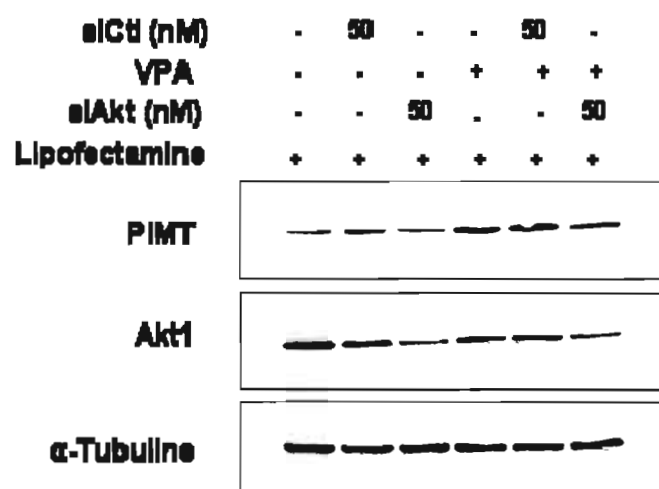


Figure 3.3 L'induction de l'expression de la PIMT par VPA est dépendante de la voie PI3K/Akt. Les cellules SH-SY5Y ont été pré-incubées pendant 1 h avec deux inhibiteurs de PI3K, soit la wortmannin (Wn) à 50 nM et le LY294002 (Ly) à 20 μ M. Le véhicule, DMSO, a été utilisé comme contrôle (Ctl) dans les cellules non traitées. Par la suite, les cellules ont été incubées avec ou sans 5 mM VPA pendant 24 h. Les cellules ont été lysées et les protéines des lysats ont été séparées par SDS-PAGE. L'expression de la PIMT, de

phospho-Akt (Thr308) et de Akt1 a été analysée par l'immunobuvardage de type Western (**A**). Les histogrammes représentent le ratio de l'expression de la PIMT des cellules traitées comparativement aux cellules contrôles, déterminé par les analyses densitométriques. Ces valeurs ont été normalisées par rapport à la quantité de Akt. (**B**). Chaque colonne représente la moyenne de trois expériences \pm l'écart type. Le student t test indique une différence significative (* $p < 0.05$) entre les cellules contrôles et les cellules traitées et ce pour la même période d'incubation. L'analyse One-way ANOVA indique les valeurs significativement différentes ($\diamond p < 0.05$) entre les traitements au VPA.

A



B

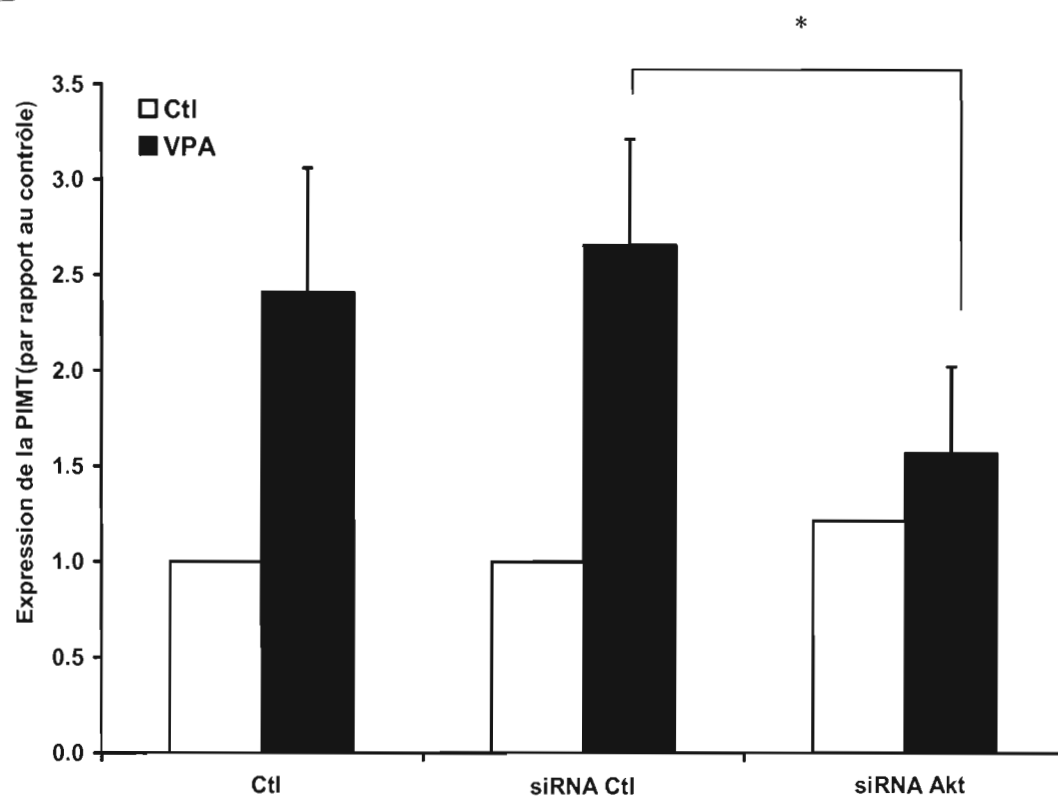
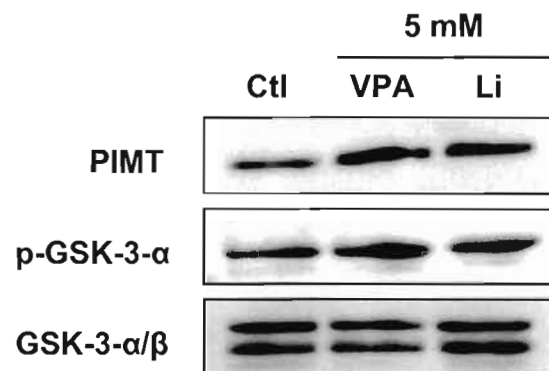


Figure 3.4 L'induction de l'expression de la PIMT par VPA est dépendante de la kinase Akt. Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec un siRNA (50 nM) contre Akt ou un siRNA (50 nM) contrôle négatif durant 48 heures. Les cellules contrôles étaient maintenues en présence de lipofectamine et le VPA a été ajouté aux cellules après 24 heures

de transfection. Les protéines des lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western avec des anticorps dirigés contre la PIMT, Akt1 et α -tubuline (**A**). Les histogrammes représentent le ratio de l'expression de la PIMT entre les cellules traitées avec VPA comparativement aux cellules contrôles, calculé par analyse densitométrique (**B**). Les cellules incubées avec la lipofectamine ont servi de contrôle aux cellules traitées uniquement avec le VPA et les cellules transfectées avec le siRNA contrôle ont servi de comparaison aux cellules transfectées avec le siRNA contre Akt. Chaque colonne représente la moyenne de trois expériences indépendantes \pm l'écart type. Le student t test indique une différence significative (* $p < 0.05$) entre les cellules incubées avec le siRNA contrôle et les cellules transfectées avec le siRNA Akt et ce pour la même période d'incubation.

A



B

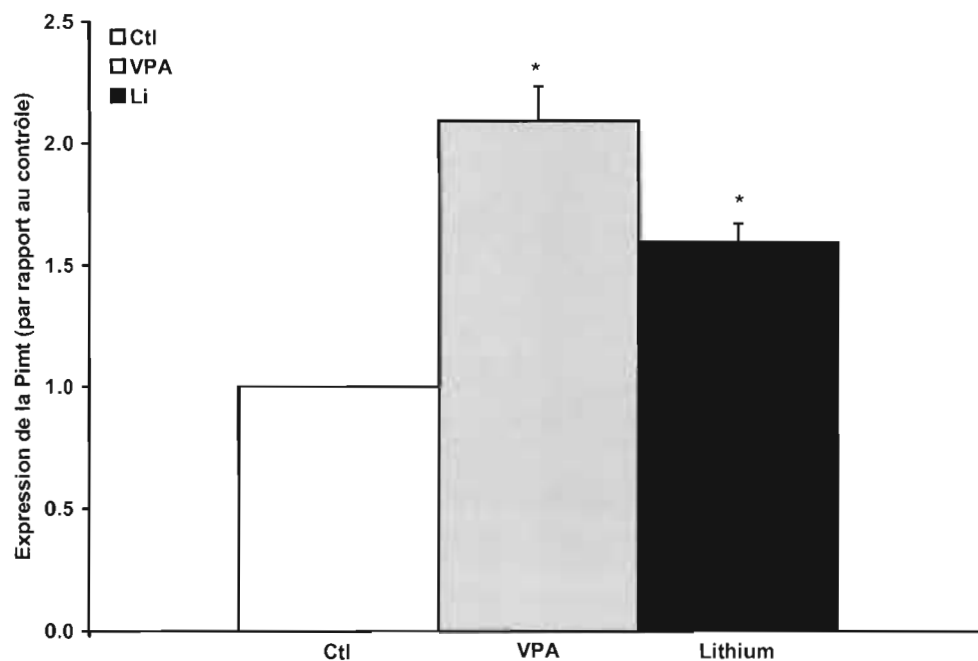


Figure 3.5 L'induction de l'expression de la PIMT par le VPA est dépendante de la kinase GSK-3. Les cellules SH-SY5Y ont été traitées avec 5 mM VPA ou 5 mM lithium pendant 24 heures comparativement aux cellules contrôles (Ctl). Les cellules ont été lysées et les concentrations protéiques déterminées. Les protéines des lysats cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage de type Western avec des anticorps dirigés contre la PIMT, phospho-GSK-3α (Ser21) et GSK-3α/β (A). Les histogrammes représentent le ratio dans l'expression de la PIMT entre les cellules traitées comparativement au contrôle, évalué par analyse densitométrique (B). Chaque colonne représente la moyenne de trois expériences indépendantes \pm l'écart type. Le student t test indique une différence significative (*p < 0.05) entre les cellules traitées et les cellules contrôles.

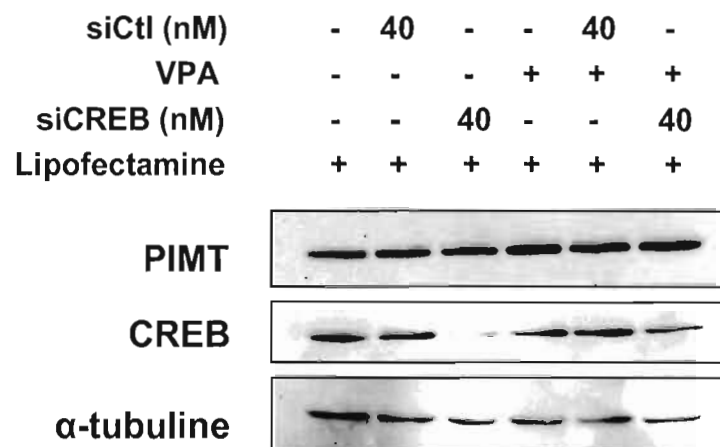


Figure 3.6 L'induction de l'expression de la PIMT par VPA ne dépend pas du facteur de transcription CREB. Les cellules SH-SY5Y ont été transfectées avec un siRNA (40 nM) contre CREB ou un siRNA contrôle négatif durant 48 heures. Le VPA a été ajouté aux cellules 24 heures après les transfections et les cellules contrôles étaient maintenues en présence de lipofectamine. Les protéines des lysats cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western avec des anticorps dirigés contre la PIMT, CREB et α -tubuline.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La principale fonction de la PIMT est de réparer des protéines anormales ayant des résidus L-isoaspartates dans leur séquence. C'est le cas du collagène de type I comme il l'a été démontré chez les rats âgés (Lanthier et Desrosiers, 2004). Notamment, l'accumulation des protéines endommagées est particulièrement dommageable dans le cerveau. Effectivement, la PIMT pourrait jouer un rôle crucial dans plusieurs pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Shimizu et al, 2000) et l'épilepsie (Kim et al, 1997; Yamamoto, Takagi et Kitamura, 1998; Lanthier et al, 2002). Le lien entre l'épilepsie et la PIMT a été surtout démontré chez les souris déficientes en PIMT (PIMT^{-/-}). Ainsi, l'analyse des protéines du cytosol des différents tissus des souris transgéniques, a montré un niveau de résidus isoaspartates de 4 à 8 fois plus élevé comparativement aux souris sauvages (Kim et al., 1997). Contrairement aux souris sauvages, les souris transgéniques présentaient plusieurs anomalies dont un retard significatif en terme de croissance et des convulsions fatales, typiques de l'épilepsie, observés à l'âge de 4 à 6 semaines.

Notre laboratoire a déjà démontré qu'une dose thérapeutique de 1 mM VPA induit l'expression de la PIMT d'environ deux fois dans les cellules astrocytomes U-87 MG et les neuroblastomes SH-SY5Y (Cournoyer et Desrosiers 2009). De plus, nous avons démontré cette induction de la PIMT par le VPA est dépendante de deux voies de signalisation clés pour le maintien du système nerveux central. Tout d'abord, la voie de GSK-3, qui est grandement étudiée dans les désordres psychologiques comme la dépression et le désordre bipolaire (Frey et al., 2004). En effet, la kinase GSK-3 qui fait partie de la voie de signalisation de Wnt est la cible principale du lithium qui est le médicament le plus prescrit pour traiter le désordre bipolaire (Jope, 2003). Or, notre laboratoire a démontré que l'inhibition de la kinase GSK-3 par le lithium ou le VPA est primordiale à l'expression de la PIMT, car elle permet la stabilisation de la protéine β -caténine (Lamarre et Desrosiers, 2008). Récemment, nous avons également identifié la voie de ERK comme étant une voie de signalisation activée par le VPA permettant ainsi l'induction de la PIMT (figure 1.5)

(Cournoyer et Desrosiers, 2009). La voie de signalisation ERK joue un rôle clef dans la neurogenèse et la formation et la plasticité synaptique. Cette voie de signalisation converge ultimement vers l'inhibition de la protéine GSK-3 grâce à la kinase RSK1 et la stabilisation de la β -caténine.

Dans le même ordre d'idée, notre étude visait à approfondir les connaissances concernant les voies de signalisation qui régulent l'expression de la PIMT lorsqu'elle est induite par le médicament anticonvulsant valproate. La voie de signalisation que nous avons ciblée était la voie de PI3K/Akt et ce pour divers raisons. Premièrement, cette voie est reconnue comme étant activée par le VPA (Sarno et al., 2002). Deuxièmement, la kinase Akt phosphoryle la kinase GSK-3 sur la serine 21 ce qui engendre son inactivation (Ali et al., 2001). Or, nous avons déjà démontré que l'inhibition de cette kinase est primordiale à l'expression de la PIMT (Lamarre et Desrosiers, 2008).

Ici, nous démontrons que l'induction de la PIMT dans les cellules SH-SY5Y par le VPA est dépendante de la concentration de ce dernier et de la durée du traitement. Ainsi, nous avons pu déterminer qu'une concentration de 5 mM VPA pendant 24 heures de traitement induisait l'expression de la PIMT d'environ deux fois (figure 3.1). Notre étude a également démontré que l'activité de la PIMT augmentait avec l'expression de celle-ci (figure 3.2). En effet, des essais de méthylation nous ont permis de constater que l'activité de la PIMT induite par VPA était proportionnelle à son niveau d'expression. Donc, une concentration de 5 mM VPA pendant 24 heures induisait une augmentation d'environ deux fois d'expression de la PIMT mais également de son activité démontrant que l'enzyme induite était fonctionnelle.

L'inhibition de la kinase PI3K par deux agents pharmacologiques, wortmannine et LY294002, nous a permis de constater que l'induction de la PIMT par le VPA était dépendante de la protéine PI3K (figure 3.3). De plus, on a pu constater que le niveau de phosphorylation de Akt sur la Thr308 augmentait lorsqu'on traitait les cellules avec le VPA et que cette phosphorylation était complètement inhibée lorsque les cellules étaient prétraitées avec les inhibiteurs de PI3K. Puisqu'il est clairement établi que la phosphorylation de Akt dépend de l'activité de la PI3K (Persad et al., 2001) ces données

suggèrent que l'induction d'expression de la PIMT par le VPA pourrait impliquer la kinase Akt. Effectivement, l'inhibition de la kinase Akt par un siRNA spécifique est venue supporter notre hypothèse que cette protéine participe à l'expression de la PIMT lorsque celle-ci est induite par VPA. En effet, les résultats montrent que l'induction de la PIMT par le VPA était bloquée lorsque Akt était inhibée (figure 3.4).

Lorsque nous avons inhibé la kinase GSK-3 avec le lithium et le VPA, nous avons observé une induction de la PIMT ce qui concordait avec nos observations précédentes (Lamarre et Desrosiers, 2008). Contrairement à Akt, la phosphorylation de GSK-3 α sur la Ser21 provoque son inhibition et permet la stabilisation de la β -caténine. Sachant que le lithium est un inhibiteur direct de la kinase GSK-3 et un inhibiteur indirect via la voie de signalisation d'Akt, nos observations suggèrent que le VPA participe à l'inhibition de GSK-3 en activant la voie de signalisation PI3K/Akt (figure 3.5) (Beaulieu et al. 2008). Puisque le lithium inhibe la kinase GSK-3, nous pouvons présumer que l'augmentation du niveau d'expression de la PIMT est due à l'inhibition de celle-ci. Nos observations concordent avec les données de la littérature qui démontrent que la voie de signalisation PI3K/Akt peut participer à l'inhibition de GSK-3 (Sarno et al., 2002).

Finalement, l'inhibition du facteur de transcription CREB n'a pas eu d'impact sur l'expression de la PIMT induite par le VPA (figure 3.6). Même si la région du promoteur de la PIMT contient des séquences consensus CRE, cible de liaison du facteur de transcription CREB à l'ADN, l'induction de la PIMT par le VPA ne semble pas dépendre de cette protéine. En effet, il est possible que l'induction de la PIMT par le VPA passe préférentiellement par la stabilisation de la β -caténine ce qui implique le recrutement des facteurs de transcription de la famille Tcf/Lef. La famille des facteurs de transcription TCF comprend quatre protéines, TCF-1, LEF, TCF-3 et TCF-4. Elle est étroitement liée à la voie de signalisation Wnt et par le même fait à la kinase GSK-3 (Brantjes et al., 2002). Lorsque la voie de signalisation de Wnt est activée, il se produit une translocation de la β -caténine au noyau. Cette dernière forme un complexe avec les protéines TCF et lie l'ADN permettant la transcription des gènes cibles. La séquence consensus permettant la liaison des facteurs de transcription TCF est AGATCAAAGGG et elle est fortement conservée chez les mammifères.

La technique de gène rapporteur permettra peut être d'identifier le facteur de transcription qui participe à l'expression de la PIMT. Dans nos expériences futures, nous planifions cloner le promoteur de la PIMT dans un système de gène rapporteur couplé à la luciférase. Ensuite, il s'agira de transfecter les cellules SH-SY5Y avec ce plasmide et de les traiter avec le VPA afin de mesurer l'activité du promoteur de la PIMT. En créant des délétions séquentielles du promoteur nous espérons identifier la région du promoteur de la PIMT qui est responsable de l'expression de celle-ci lorsqu'elle est induite par VPA. La localisation de la région du promoteur responsable de l'induction du gène PIMT par le VPA facilitera l'identification du ou des facteurs de transcription que cet agent anticonvulsant utilisent pour stimuler l'expression de la PIMT.

Tout en étant un excellent médicament anticonvulsant, le valproate est également utilisé pour traiter d'autres problèmes neurologiques non-épileptiques comme la douleur neuropathique, les migraines ainsi que les troubles psychiques comme l'anxiété, la schizophrénie et le trouble bipolaire (Bowden, 2007). Nos résultats ont montré que le valproate stimule l'expression de la PIMT via la voie de signalisation PI3K/Akt/GSK-3. Cela signifie également que cette voie de signalisation est possiblement stimulée par ce médicament dans plusieurs désordres psychologiques où on l'utilise comme traitement. Un bon exemple est le trouble bipolaire où le valproate est utilisé comme stabilisateur d'humeur et son effet inhibiteur de la kinase GSK-3 est comparable à l'effet du lithium, son inhibiteur direct et indirect via la voie de signalisation d'Akt (Beaulieu et al. 2008). Il serait intéressant d'observer l'expression de la PIMT chez les patients souffrant de différents troubles psychiatriques et de vérifier si son niveau d'expression est inférieure comparativement aux personnes saines. Cela pourrait ouvrir la porte à d'autres voies de recherche concernant les mécanismes biochimiques qui régulent différents troubles psychiatriques.

CONCLUSION

La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase est une enzyme qui répare les protéines contenant des résidus aspartates anormaux. Le rôle de la PIMT devient particulièrement plus important lors du vieillissement car on observe une augmentation et une accumulation de protéines endommagées. Plusieurs études ont établi des relations entre l'expression de la PIMT et certaines maladies et troubles neurologiques. Cependant, le lien entre la PIMT et l'épilepsie est celui qui a été le plus étudié. En ce sens, notre étude a permis d'identifier une nouvelle voie de signalisation, PI3K/Akt1/GSK-3, qui contrôle l'expression de cette enzyme lorsqu'elle est induite par le valproate. De plus, nous pouvons extrapoler cette relation entre la voie de signalisation PI3K/Akt1/GSK-3 qui régule l'expression de la PIMT et d'autres troubles psychiatriques comme le désordre bipolaire. Dans les études futures, il sera intéressant d'examiner l'expression de la PIMT chez les patients qui souffrent de différents troubles psychiques incluant le désordre bipolaire. De plus, un aspect de la régulation de la PIMT demeure inconnu et il s'agit des facteurs de transcription qui contrôlent son expression. Nous avons démontré que le facteur de transcription CREB ne semble pas réguler l'expression de la PIMT quand celle-ci est induite par le valproate. Cependant plusieurs autres facteurs de transcription possèdent des séquences consensus au sein du promoteur de la PIMT. Par exemple, la famille des facteurs de transcription Tcf/Lef qui est directement activée par la β -caténine. Dans les expériences futures, il sera pertinent d'examiner l'impact de l'inhibition de ces facteurs de transcription sur l'induction de la PIMT par le valproate. L'identification des voies de signalisation qui régulent l'expression de la PIMT pourront dans le futur permettre l'élaboration de nouveaux médicaments pour traiter l'épilepsie mais possiblement aussi différents troubles psychiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ. 1998. «Protein methylation: a signal event in post-translational modification». *Trends. Biochem. Sci.*, vol. 23, p. 89-91
- Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR. 2001. «Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation». *Chem. Rev.*, vol. 101, p. 2527-2540
- Aswad D. W. and Deight E. A. 1983. «Purification and characterization of two distinct isozymes of protein carboxymethylase from bovine brain». *J. Neurochem.* vol.40, p. 1718-1726
- Aswad, D. W. 1984. «Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues». *J. Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10714-10721.
- Barten, D. M. et R. F. O'Dea. 1990. «The function of protein carboxyl methyltransferase in eucaryotic cells». *Life. Sci.*, vol. 47, p. 181-194.
- Beaulieu JM, Caron MG. 2008. «Looking at lithium: molecular moods and complex behaviour». *Mol. Interv.*, vol. 8, p. 230-241
- Beaulieu JM, Marion S, Rodriguiz RM, 2008. «A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior». *Cell.*, vol. 132, p. 125-136
- Bergo MO, Gavino BJ, Hong C, Beibneux AP, McMahon M, Casey PJ, Young SG. 2004. «Inactivation of Icm1 inhibits transformation by oncogenic K-Ras and R-Raf». *J. Clin. Invest.*, vol. 113, p. 539-550
- Bourtchuladze R, Frengueili B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G and Silva A. J. 1994. «Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein». *Cell.*, vol. 79, p. 59-68
- Bowden, C. L. 2007. «Spectrum of effectiveness of valproate in neuropsychiatry». *Expert Rev Neurother.*, vol. 7, p. 9-16.
- Brantjes H, Barker N, van Es J, Clevers H. 2002. «TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling». *Biol. Chem.*, vol. 383, p. 255-61.
- Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. «Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow». *Trends. in Bioch. Sci.*, vol. 26, p. 657-664

- Brennan, T. V. et S. Clarke. 1995. «Deamidation and isoaspartate formation in model synthetic peptides : the effects of sequence and solution environment». In *Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins*, sous la dir. de D. W. Aswad (éd.), p. 65-90. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Brunet, A., Datta, S.R., Greenberg, M.E., 2001. «Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway». *Curr. Opin. in Neurobio.*, vol. 11, p. 297-305.
- Chazin, W. J. et A. A. Kossiakoff. 1995. «The role of secondary and tertiary structures in intramolecular deamidation of proteins». In *Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins*, sous la dir. de D. W. Aswad (éd.), p. 193-206. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang S-M, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. 1999 «Regulation of transcription by a protein methyltransferase». *Science.*, vol. 284, p. 2174-2177
- Chen, G. et H. K. Manji. 2006. «The extracellular signal-regulated kinase pathway: an emerging promising target for mood stabilizers». *Curr. Opin. Psychiatry*, vol. 19, p. 313-23.
- Clarke, S. 1985. «Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes». *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 54, p. 479-506.
- Clarke, S. 2003. « Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair ». *Ageing Res. Rev.*, vol. 2, p. 263-285.
- Cournoyer P. et Desrosiers R. R. 2009. «Valproic acid enhances protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by stimulating extracellular signal-regulated kinase signaling pathway». *Neuropharma.*, vol. 56, p. 839-848
- Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S, Philips MR. 1998. «Mammalian prenylcysteine carboxyl méthyltransférase is in the endoplasmic reticulum». *J Biol Chem.*, vol. 273, p. 15030-15034
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999. «Cellular survival: a play in three Akts». *Genes & Development.*, vol. 13, p. 2905-2927.
- David, C. L., Szumlanski, C. L., DeVry, C. G., Park-Hah, J. O. et S. Clarke. 1997. «Human erythrocyte protein L-isoaspartyl methyltransferase: heritability of basal activity and genetic polymorphism for thermal stability». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 346, p. 277-286.

- DeVry, C. G., Tsai, W. et S. Clarke. 1996. «Structure of the human gene encoding the protein repair L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 335, p. 321-332.
- DeVry, C. G. et S. Clarke. 1999. «Polymorphie forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins». *J. Hum. Genet.*, vol. 44, p. 275-288.
- Du K, Montminy M. 1998. «CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB». *J Biol Chem.*, vol. 273, p. 32377–32379
- Frey B. N, Rodrigues da Fonseca M, Machado-Vieira R, Soares J. C, Kapczinski F. 2004. «Neuropathological and neurochemical abnormalities in bipolar disorder». *Rev. Bras. Psiquiatr.*, vol. 26, p. 180-188
- Friesen WJ, Massenet S, Paushkin S, Wyce A, Dreyfuss G. 2001. «SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets». *Mol. Cell.*, vol. 7, p. 1111–1117
- Geiger T. and Clarke S. 1987. «Deamidation, isomerization and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides». *J. Biol. Chem.*, vol. 262, p. 785–794
- Galletti, P., Ingrosso, D., Manna, c., Clemente, G. et V. Zappia. 1995. «Protein damage and metbylation-mediated repair in the erythrocyte». *Biochem. 1.*, vol. 306, p. 313-325.
- Johannessen, C. U. 2000. «Mechanisms of action of valproate: a commentary». *Neurochem. Int.*, vol. 37, p.103-110.
- Johnson, B. A., Freitag, N. E. et D. W. Aswad. 1985. «Protein carboxyl methyltransferase selectively modifies an atypical form of calmodulin. Evidence for methylation at deamidated asparagine residues». *J. Biol. Chem.*, vol. 260, p. 10913-10916
- Johnson, B. A, Langmack, E. L. et D. W. Aswad. 1987. «Partial repair of deamidationdamaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 262, p. 12283-12287
- Johnson, B. A. et D. W. Aswad. 1995. «Deamidation and isoaspartate formation during in vitro aging of purified proteins». In *Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins*, sous la dir. de D. W. Aswad (éd.), p. 91-113. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Jope R.S. 2003. «Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes». *Trends. Pharmacol. Sci.*, vol 24, p. 441-443
- Kim, S. et W. K. Paik. 1970. «Purification and properties of protein methylase II». *J. Biol. Chem.*, vol. 245, p. 1806-1813.

- Kim, E., Lowenson, J. D., MacLaren, D. c., Clarke, S. et S. G. Young. 1997. «Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, p. 6132-6137.
- Kim, E., Lowenson, J. D., Clarke, S. et S. G. Young. 1999. «Phenotypic analysis of seizure-prone mice lacking L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 20671-20678.
- Kort, E. N., Goy, M. F., Larsen, S. H. et J. Adler. 1975. «Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, p. 3939-3943.
- Lamarre, M. et Desrosiers R. R. 2008. «Up-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase expression by lithium is mediated by glycogen synthase kinase-3 inactivation and b-catenin stabilization». *Neuropharma.*, vol 55, p. 669-676
- Lanthier, J., Bouthillier, A, Lapointe, M., Demeule, M., Béliveau, R. et R. R Desrosiers. 2002. «Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin». *J. Neurochem.*, vol. 83, p. 581-591.
- Lanthier, J. et R. R. Desrosiers. 2004. «Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration». *Exp. Cell. Res.*, vol. 293, p.96-105.
- Lebreton, S., Carraz, G., Meunier, H. et H. Beriel. 1964. «Pharmacodynamic properties of 2,2-dipropylaceticacid. 2nd report on its anti-epileptic properties». *Therapie*, vol. 19, p. 451-456.
- Lee J, Stock J. 1993. «Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methylesterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 268, p. 19192–19195
- Liss, M., Maxam, A M. et I. J. Cuprak. 1969. «Methylation of protein by calf spleen methylase. A new protein methylation reaction». *J. Biol. Chem.*, vol. 244, p. 1617-1622.
- Löscher, W. 1989. «Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra». *Brain Res.*, vol. 501, p.198-203.
- MacLaren, D. c., Kagan, R. M. et S. Clarke. 1992. «Alternative splicing of the human isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase RNA leads to the generation of a C-terminal -RDEL sequence in isozyme II». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 185, p. 277-283.

- Mann, D. M. 1985. «The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, aetiological and therapeutic considerations». *Meeh. Ageing Dev.*, vol. 31, p. 213-255.
- McFadden P. N. and Clarke S. 1987. «Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: Implications for the cellular repair of damaged proteins». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 84, p. 2595-2599
- Murray Jr., E. D. et S. Clarke. 1984. «Synthetic peptid substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues». *J.Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10722-10732.
- Ondetti M. A., Deer A., Sheehan J. T., Pluscec J. and Kocy O. 1968. «Side reactions in the synthesis of peptides containing the aspartylglycyl sequence». *Biochemistry.*, vol. 7, p. 4069-4075
- Ota, J. M., Gilbert, J. M. et S. Clarke. 1988. «Two major isozymes of the protein Daspartyl/L-isoaspartyl methyltransferase from human erythrocytes». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 151, p. 1136-1143.
- Patel K. and Borchardt R. T. 1990. «Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide». *Pharm. Res.* vol 7, p. 703-711
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M. P., & Dedhar, S. 2001. «Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343». *J Biol Chem*, vol. 276, p. 27462-27469.
- Perucca, E. 2002 «Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience». *CNS Drugs*, vol. 16, p. 695-714.
- Reissner K. J., Aswad D. W. 2003. «Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals?». *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, p. 1281-1295
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Wolkow, c., Wang, R., Cotter, R. J., Reardon, J. M., Zurcher, N. H., Heinrikson, R. l., Bail, M. l. et R. D. Greenberg. 1993. «Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease». *J. Biol. Chem.*, vol. 268, p. 3072-3083.
- Ryttersgaard, C., Griffith, S. C., Sawaya, M. R., MacLaren, D. C., Clarke, S. et T O. Yeates. 2002. «Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase». *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 10642-10646.

- Ryves, W.J. and Harwood, A.J. 2001. «Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 280, p. 720–725
- Sarno P. D. Li X. Jope R. S 2002. «Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation by sodium valproate and lithium». *Neuropharma.*, vol. 43, p. 1158–1164
- Shen EC, Henry MF, Weiss VH, Valentini SR, Silver PA, Lee MS. 1998. «Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins». *Genes. Dev.*, vol. 12, p. 679–691
- Shimizu, T., Watanabe, A, Ogawara, M., Mori, H. et T Shirasawa. 2000. «Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 381, p. 225–234.
- Shimizu, T, Matsuoka, Y. et T. Shirasawa. 2005. «Biological significance of isoaspartate and its repair system». *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, p.1590–1596.
- Smyth D. G., Stein W. H. and Moore S. 1963. «The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations». *J. Biol. Chem.* Vol. 238 p. 227–234
- Stephenson R. C. and Clarke S. 1989. «Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins». *J. Biol. Chem.*, vol. 264, p. 6164–6170
- Stock, J. 1990. «Role of protein carboxyl methyltransferase in bacterial chemotaxis». In *Protein methylation, sous la dir. de W. K. Paik et S. Kim (éd.)*, p. 275–284. Boca Raton (FL) : CRC Press.
- Stock JB, Surette MG, McCleary WR, Stock AM. 1992. «Signal transduction in bacterial chemotaxis». *J. Biol. Chem.*, vol. 267, p. 19753–19756
- Tsai, W. et S. Clarke. 1994. «Amino acid polymorphisms of the human L-isoaspartyl/Daspartyl methyltransferase involved in protein repair». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 203, p. 491–497.
- Tyler-Cross R. and Schirch V. 1991. «Effects of amino acid sequence, buffers and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides». *J. Biol. Chem.*, vol 266, p 22549–22556
- Watanabe, A, Takio, K. et Y. Thara. 1999. «Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments: unusual properties of the microtubulebinding domain of tau». *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 7368–7378.

- Watters J. W. et Roberts C. J. 2006. «Developing gene expression signatures of pathway deregulation in tumors». *Mol. Cancer. Ther.*, vol. 5, p. 2444-2449
- Xie H, Clarke S. 1994. «Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain». *J. Biol. Chem.*, vol. 269, p. 1981–1984
- Xie M, and Schowen R. L. 1999. «Secondary structure and protein deamidation». *J. Pharm. Sci.*, vol 88, p. 8–13
- Yamamoto, A, Takagi, H., Kitamura, D., Tatsuoka, H., Nakano, H., Kawano, H., Kuroyanagi, H., Yahagi, Y., Kobayashi, S., Koizumi, K., Sakai, T, Saito, K., Chiba, T., Kawamura, K., Suzuki, K., Watanabe, T, Mori, H. et T Shirasawa. 1998. «Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-2074.